

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-503645

第6部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)4月21日

(51) Int.Cl.<sup>3</sup> 識別記号 厅内整理番号 F I  
 G 01 N 33/53 V 8310-2 J  
 C 12 Q 1/42 6807-4 B

		審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 18 頁)
(21)出願番号	特願平4-502401	(71)出願人 アデザバイオメディカル コーポレイション
(86) (22)出願日	平成3年(1991)12月9日	アメリカ合衆国, カリフォルニア 94089,
(85)翻訳文提出日	平成5年(1993)6月14日	サンベール, エルコ ドライブ 1240
(86)国際出願番号	PCT/US91/09259	(72)発明者 セニエイ, アンドリュー イー,
(87)国際公開番号	WO92/10585	アメリカ合衆国, カリフォルニア 92675,
(87)国際公開日	平成4年(1992)6月25日	サン ジュアン カピストラーノ, ヒルティ
(31)優先権主張番号	628, 282	イップ ウェイ 30551
(32)優先日	1990年12月14日	(72)発明者 テン, ネルソン エヌ. エイチ.
(33)優先権主張国	米国(US)	アメリカ合衆国, カリフォルニア 94010,
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), AU, CA, JP	ヒルズボロー, ブルーベル レーン 24
(74)代理人	弁理士 宇井 正一 (外4名)	

(54)【発明の名称】胎児制限抗原の決定のための試薬及びキット

## (57)【要約】

本発明は、正常な又は子宮外妊娠、妊娠の終結又は早期分娩及び膜の破裂の高まつた危険性の検出のための方法、試薬及びキットに関する。個々の態様は、腔腔からサンプリング及び試験サンプルにおける特定の分析物の存在又は不在の決定を包含する。サンドイッチ又は競争アッセイ方法が使用され得る。上記アッセイのための試薬及び試薬キットが包含される。

添書(内容に変更なし)

請求の範囲

1. 試験サンプルにおける胎児制限抗原の検出のためのキットであって：
  - a. 不活性支持体に付着される抗体-(胎児制限抗原)抗体：及び
  - b. 抗-(胎児制限抗原クラス)抗体を含んで成るキット。
2. 前記抗-(胎児制限抗原)抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲第1項記載のキット。
3. 前記抗-(胎児制限抗原)抗体が抗体-(胎児フィプロネクチン)抗体である請求の範囲第1項記載のキット。
4. 前記抗-(胎児制限抗原クラス)抗体がポリクローナル抗体である請求の範囲第1項記載のキット。
5. 前記抗-(胎児制限抗原クラス)抗体が抗体-フィプロネクチン抗体である請求の範囲第1項記載のキット。
6. 前記抗-(胎児制限抗原クラス)抗体がラベルされる請求の範囲第1項記載のキット。
7. 前記ラベルが酵素である請求の範囲第6項記載のキット。
8. 前記キットが、酵素基質をさらに含んで成る請求の範囲第1項記載のキット。
9. 前記キットが、正の対照をさらに含んで成る請求の範囲第1項記載のキット。
10. 前記キットが、サンプル通過装置をさらに含んで成る請求の範囲第1項記載のキット。
11. 試験サンプルにおける胎児フィプロネクチンの検出のためのキットであって：
  - a. 不活性支持体に付着される抗体-(胎児フィプロネクチン)抗体：及び

記載のキット。

25. 前記正の対照が既知胎児フィプロネクチン濃度の半水である請求の範囲第24項記載のキット。
26. 前記胎児フィプロネクチン濃度が約10～約100 ng/mlである請求の範囲第25項記載のキット。
27. 前記半水が、0.05Mのトリス緩衝液、pH7.4、1%ウシ血清アルブミン、0.15Mの塩化ナトリウム、0.02%のアジ化ナトリウム、5 ngのエチレンジアミン四酢酸、1 ngのフェニルメチルスルホニルフルオリド及び500 カリクレイン単位/mlアプロチニンの溶液に稀釈される請求の範囲第26項記載のキット。
28. 前記キットが負の対照をさらに含んで成る請求の範囲第11項記載のキット。
29. 前記負の対照が、0.05Mのトリス緩衝液、pH7.4、1%ウシ血清アルブミン、0.15Mの塩化ナトリウム、0.02%のアジ化ナトリウム、5 ngのエチレンジアミン四酢酸、1 ngのフェニルメチルスルホニルフルオリド及び500 カリクレイン単位/mlアプロチニンの溶液である請求の範囲第28項記載のキット。
30. 前記キットが少なくとも1つのサンプル通過装置をさらに含んで成る請求の範囲第11項記載のキット。
31. 前記サンプル通過装置が予定された体積の通過されたサンプルを分離する請求の範囲第30項記載のキット。
32. 前記キットがすすぎ用緩衝液をさらに含んで成る請求の範囲第11項記載のキット。
33. 前記すすぎ用緩衝液が0.02Mのトリス、0.08Mの塩化ナトリウム及び0.05%のTween-20である請求の範囲第32項記載のキット。
34. 前記すすぎ用緩衝液がアジ化ナトリウムをさらに含んで成る請求の範囲第33項記載のキット。

特表平6-503645 (Z)

- b. 抗-フィプロネクチン抗体を含んで成るキット。
12. 前記抗-(胎児フィプロネクチン)抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲第11項記載のキット。
13. 前記抗-(胎児フィプロネクチン)抗体がFDC-6である請求の範囲第12項記載のキット。
14. 前記抗-フィプロネクチン抗体がポリクローナル抗体である請求の範囲第11項記載のキット。
15. 前記抗-フィプロネクチン抗体がラベルされる請求の範囲第10項記載のキット。
16. 前記ラベルが酵素である請求の範囲第15項記載のキット。
17. 前記酵素がアルカリホスファターゼである請求の範囲第16項記載のキット。
18. 前記キットが酵素基質をさらに含んで成る請求の範囲第11項記載のキット。
19. 前記酵素基質がフェノールフタレンモノキスフュートである請求の範囲第18項記載のキット。
20. 前記ラベルがコロイド状態である請求の範囲第15項記載のキット。
21. 前記不活性支持体がマイクロタイターブレート、又はマイクロタイターブレートの皿のストリップを含んで成る請求の範囲第11項記載のキット。
22. 前記キットがマイクロタイターブレートカバーをさらに含んで成る請求の範囲第21項記載のキット。
23. 前記キットが、マイクロタイターブレートの皿のストリップを含み、そして前記ストリップのためのホルダーをさらに含んで成る請求の範囲第21項記載のキット。
24. 前記キットが正の対照をさらに含んで成る請求の範囲第11項記載のキット。
25. 前記すすぎ用緩衝液が過塩素酸でパッケージされる請求の範囲第33項記載のキット。
26. 前記面相が膜である請求の範囲第11項記載のキット。
27. 前記膜がナイロンである請求の範囲第36項記載のキット。
28. 前記膜が吸着層上に置かれる請求の範囲第36項記載のキット。
29. 流れ調節層が前記膜及び前記吸着層の中間に存在する請求の範囲第36項記載のキット。
30. 前記キットが、ラベルされた抗-フィプロネクチン抗体を含むサンプル通過装置をさらに含んで成る請求の範囲第36項記載のキット。

特許(内容に変更なし)

明細書

胎児制限抗原の決定のための試料及びキット

開示出願の相互参照

本願は、1988年11月16日付け出願の米国特許第07/274,260号、1988年9月15日付け出願の米国特許第07/244,969号、1988年11月18日付け出願の米国特許第07/274,267号、および1988年12月12日付け出願の米国特許第07/282,426号の一部を組合せたものである。上記出願の発明者は Andrew E. Senechal および Nelson L. E. Teng である。これらの各出願は全体を本願に組込むものとする。

発明の技術分野

本発明は、正常妊娠と子宮外妊娠；妊娠の終了；および早期分娩と羊膜破裂の危険が増大していることを免疫学的に検出するのに用いる試料とキットに関するものである。

発明の背景

妊娠を決定する多種類の試験法が開発されている。商業的な妊娠の早期検定法には最も多くは血清の検定法が含まれている。尿中の hCG (ヒト妊娠ホルモン) を測定する妊娠妊娠試験法としては、各種の酵素検定法、電極吸収阻止反応法、および月经が停止してから7日間までの間に妊娠を指示するのに有効な状態インジケーター試験法がある。特に、子宮外妊娠のような異常妊娠を決定するには医師による確認が推奨される。

hCG は胎児栄養芽嚢によって産生され、胎盤中の胎毛問題を通じて胎児血清から母親の血清へと流れれる。母親の血清と尿中の hCG の

特許平6-503645(3)

濃度は約3週間後から検出可能になる場合が多い。血清もしくは尿の hCG 試験法の濃度は、産生される hCG の量が胎児栄養芽嚢の量および母親の体液中の hCG を測定することによって測定されるので、明確である。母 hCG に特異的に結合する抗体が開発されるまでは、LH (黄体化ホルモン) との交叉反応があるので濃度のレベルに制限がある。

本発明の発明者は、子宮頸管、子宮頸OSもしくは他の後部円盤、好ましくは外側子宮頸部もしくは後部円盤の近傍から取出した試料を、胎児制限抗原、すなわち胎盤組織で産生されかつ実質的な量では母親の血清中に流れることがない化合物もしくは物質の存在について試験することによって、正常な子宮妊娠を、妊娠サイクル中、早期に、確実に決定できることを見出したのである。この種の技術としては胎児フィプロネクチンがある。

本発明の発明者は、子宮頸管もしくは子宮頸OSの近傍から取出した試料を、胎児制限抗原 (fetal restricted antigen)、すなわち胎盤組織で産生され、実質的な量では母親の血清に流れることがない化合物もしくは物質の存在について試験することによって、子宮外妊娠を検定できることを見出した。この種の物質としては胎児フィプロネクチンが含まれる。血清もしくは尿による妊娠試験によって妊娠について陽性という試験結果が得られた試験者由来の試料中の胎児制限抗原が著しく少ない場合は、子宮外妊娠を示している。

治療的摘除または自然摘出中に露出される子宮組織中の、受胎による ex vivo 産物の存在を検定することは、子宮妊娠の存在とその終了を確認じかづ子宮外妊娠が存在しないと判定するのに極めて重要である。母親の血清または尿中の胎児制限抗原の濃度が妊娠を表示し、かつ治療的摘除中に露出された子宮組織が受胎産物を含むし

ていない場合は、子宮外妊娠の可能性があることを示している。自然流産の指示物質と関連がある受胎産物が子宮排出物中に存在することによって流産が確認され、一方このような物質が存在しない場合は妊娠が無効していることを示している。胎盤由来の試験試料中に胎児制限抗原が存在することを測定する通常の免疫検定法は、これらの試料が一緒に母親の血清を含んでいるので、受胎産物が存在することを指示するには確実ではない。妊娠抗原と胎児抗原類は、通常、胎児と胎盤の組織中のみならず母親の血清中にも存在している。

早期出産が迫っていることを決定することは、早期出産児の新生児生存を増大させるのに重要である。羊膜の破裂を検出することは、真の分娩と偽分娩を識別するのに重要である。羊膜の破裂が小さくかつ羊水の漏出量が少ない場合は羊膜破裂が検出されない場合が多い。破裂した羊膜を検出する方法で確認されている方法は、主観的であり、感度が不完全でかつ特異的でない。妊娠20週間後に、早期分娩および羊膜破裂の危険が増大していることを検出する本発明の実施態様は、後部円盤、子宮頸管、または子宮頸OSの近傍から取出した試験試料の検定法に関するものである。

発明の要約

本発明の方針は、妊娠の存在および/または状態を決定するのに用いる。本発明の方針は、體液由来の試験試料中に妊娠指示物質が存在することを決定するのに用いられ、下記の方法で構成されている。すなわち、

(a) 子宮頸管または子宮頸OSの近傍の試験試料を採取し、改めて試験中に胎児制限抗原が存在することを決定することからなる妊娠の最初の20週間中に正常な子宮妊娠を決定する方法；

(b) 妊娠の最初の20週間中、妊娠患者から子宮頸管または子宮頸OSの近傍の試験試料を採取し、改めて試験中に胎児制限抗原が存在しないことを決定することからなる妊娠妊娠を決定する方法；

(c) 子宮から採取ししくは取出された試験試料を採取し、改めて試験中に胎児制限抗原が存在することを決定することからなる受胎の ex vivo 産物を決定する方法；または

(d) 妊娠してから20週間後、患者から後部円盤、子宮頸管または子宮頸OSの近傍の試験試料を採取し、改めて試験中に胎児制限抗原が存在することを決定することからなる早期分娩もしくは胎児妊娠破裂の危険が増大していることを決定する方法である。

本発明の検定法で使用する試験としては、標識付きおよび標識なしの抗 (被検体) 抗体類すなわち抗 (胎児フィプロネクチン) 抗体類のような抗 (胎児制限抗原) 抗体類；抗 (被検体クラス) 抗体類すなわち抗 (フィプロネクチン) 抗体類のような抗 (胎児制限抗原クラス) 抗体類などがある。本発明の検定法で使用する他の試験としては、抗 (被検体) 抗体類すなわち抗 (胎児フィプロネクチン) 抗体類のような抗 (胎児制限抗原) 抗体類；抗 (被検体クラス) 抗体類すなわち抗 (フィプロネクチン) 抗体類のような抗 (胎児制限抗原クラス) 抗体類などを付与させた不活性の支持体がある。標識付きもしくは標識なしの試験の胎児制限抗原類も本発明の試験である。本発明の検定法で使用される試験には、試験被検体を付与させた不活性支持体、すなわち胎児制限抗原類を付与させた不活性支持体も含まれる。本発明の検定法で使用する試験には、標識付き二次抗体のような免疫検定用抗体、陽性と陰性の対照、酵素基質のような酵素免疫試薬、および洗浄液洗浄液も含まれる。

本発明には、上記試験の中の1つのみ、他の試験を組合せたもの、または試験用試験用の組合せたキットが含まれる。

#### 特表平6-503645 (4)

れる。試験題は、キット中に、適切ないかなる形態で入っていてもよく、例えば容器、包装物などの形態でもよい。

##### 胎児の妊娠を説明

妊娠の存在および/または妊娠を決定する本発明の方法は、膀胱から取出された、後部円錐、子宮頸管または子宮頸OS、特に子宮頸管もしくは子宮頸OSの近傍の試験試料中、胎児制限抗原の存在を決定することからなる方法である。本発明の具体的な実施形態は、正常な子宮妊娠、子宮外妊娠、適度的もしくは自然の後産の発生、および早期分娩もしくは早産後産の危険が増大していることを決定するのに利用される。

本発明の方法を実施するのに有用な試験とキットについても説明する。

##### 胎児制限抗原検定法と試験

胎児制限抗原検定法は、後部円錐、子宮頸管または子宮頸OSの近傍の取出された試験試料中の胎児制限抗原、すなわち特に胎児もしくは胎盤にのみ見出された物質の検出を行う。本発明の発明者らは、検出可認な量のこれらの物質が上記の試験中に存在するということを発見した。胎児制限抗原は、母親の血液中には有意な量で存在しないので、試験中に母親の血液が存在していても試験は妨害されない。

本願で用いる“胎児制限抗原”という用語は、胎児もしくは胎盤にのみ由来する物質であって、母親の血液、血清もしくは尿中には存在しないか、または母親の血液、血清もしくは尿中に有意な量では存在しない物質を意味すると定義する。この定義に合致するいずれの物質も、上記用語の意味の範囲内に含まれることを意味し、こ

れらの物質としては、免疫原性の物質とタンパク質、および純品の活潰では免疫原性ではないが、それらに対して特異的もしくは適切的な抗体と適切に結合できる後得のエビトープを有する他の物質の両者が含まれる。胎児制限抗原の例は、B. Nakamura and S. Nakayosi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82巻, 6517-6521頁、1985年に報告されたFDC-6モノクローナル抗体と特異的に結合する胎児フィプロネクチンである。またFDC-6抗体を產生するハイブリドーマ (the American Type Culture Collectionに受託番号ATCC 6B 9018で寄託されている) の製造は、1990年1月16日付けでNakamuraらに発行された米国特許第4,894,326号に詳細に記載されている。

本願で用いられる“胎児制限抗原クラス”という用語は、胎児制限抗原がメンバーである抗原類のクラスもしくはグループを意味すると定義する。例えば、胎児フィプロネクチンは、ヒトフィプロネクチンのグループもしくはクラスの胎児制限メンバーである。

本願で用いる“抗体”という用語は、クラスIgG, IgM, IgA, IgDおよびIgEの抗体、ならびに抗体のフラグメントであるFabとFab<sub>2</sub>を含む、優先的に結合する、抗体のフラグメントとハイブリッドの試験体を含むと定義する。抗体はモノクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。本発明の検定法に使用するには、一般にモノクローナル抗体の方が好ましい。

免疫学的方法は、特異性を有するので本発明の検定法を実施するのに最も便利である。本願で用いる“免疫検定法”という用語は、抗原のエビトープと優先的に結合する第2物質（すなわち結合パートナー、つまり通常は抗原結合部位を有する抗体もしくは抗体フラグメント）と抗原が優先的に結合することを利用する方法を意味すると定義する。本願で用いる優先的結合という用語は、適切のおよび一般的に特異的であり、かつ交差反応性の非特異的結合が一般に10

%より少なく好ましくは5%より少ない結合パートナー間の結合を意味する。例えば、被検体が胎児フィプロネクチンの場合、抗（胎児フィプロネクチン）抗体は、成人のフィプロネクチン原との交差反応性は10%より小さく、好ましくは5%より小さい。

検定されないが上記のステップを含むすべての検定法は本発明の適用範囲に含まれる。その検定法には、例えばサンドイッチ、競合、計量法 (dip stick) 試験、比色、トランジスター・ブリッジプローブ、粒子選別、光散射、光散乱、および超音波プローブによる免疫検定法が含まれる。適切な免疫検定法は、複数として、例えば放射性同位元素標、酵素標、または蛍光標、クロモゲン原性もしくは化学発光性の物質を使ってもよい。

検定される試料は、後部円錐、子宮頸管または子宮頸OSの近傍から取出し、その試料を検定して、試料中に胎児制限抗原が存在することまたはその量が決定される。指紋が存在することを決定する方が好ましい。試料は一般に液体と粒状固体を含有し、最もしくは子宮頸の粘液、最もしくは子宮頸の他の分泌物、細胞もしくは組織の破片、革水、または胎児もしくは母親の他の物質を含有している。試料は、グローブなどの保護型先端を有するスワブ、アスピレーター、吸引用具、洗浄用具などで取出され、適切な容器に移して保管し試験室に送られる。

試験試料は、試料として取された組成物中では不安定で敏感なタンパク質の被検体を保護する液体中に分散させておくことが大切である。貯蔵と移送に用いる液体は、貯蔵と移送中にタンパク質の被検体の濃度が低下するのを防止しなければならない。貯蔵と移送に用いる適切な保存液は、0.05Mトリス-HCl, pH 7.4; 0.15M NaCl; 0.02% BSA; 1% BSA; 500 カリクレイン単位/mlのアプロテニン; 1.0%フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF); お

よび5 mM EDTA で構成され、1990年4月24日に発行された米国特許第4,919,889号に記載されている。上記の液体は、胎児フィプロネクチンを検出する限り最も好ましい試験検査液である。

胎児制限抗原の検出は、試験試料中の胎児制限抗原を、胎児制限抗原のエビトープと優先的に結合する抗体と結合させ、次いでこの結合反応があるかないかを決定することによって達成することができる。

胎児制限抗原の1つのサンドイッチ検定法では、試験試料を、抗（胎児制限抗原）抗体を付着させた不活性の支持体と接触させて、試験試料中の胎児制限抗原を不活性支持体に結合させる。次にその不活性支持体を、二次抗体である標識なしまたは標識付きの抗（胎児制限抗原）抗体と接触させると、その抗体は不活性支持体に付着している胎児制限抗原と結合し、標識された胎児制限抗原が検出測定される。

被検体の胎児制限抗原を含むクラスの物質と結合する抗体は、特異的な抗（胎児制限抗原）抗体標識抗体または特異的な抗（胎児制限抗原）抗体サンドイッチ抗体の代わりに用いることができる。例えば、抗（胎児フィプロネクチン）抗体は不活性支持体に付着させることができ、および標識付きもしくは標識なしの抗（フィプロネクチン）抗体は、標識された抗原を検出するのに使用することができる。あるいは、抗（フィプロネクチン）抗体は不活性支持体に付着させることができるので、標識付きもしくは標識なしの抗（胎児フィプロネクチン）抗体は、標識された抗原に標識を付けるのに使用される。抗（胎児制限抗原）抗体は、標識抗体として使用して、胎児制限抗原が、そのクラスの他の抗原に比較して、試料中に少しあしか存在していないときに確實に検出することが好ましい。

二次抗体は、不活性支持体上で直接測定することができる物理的

## 特表平6-503645 (5)

に検出可能な標識をもつていてもよい。あるいは二次抗体は標識なしでも、その場合、その二次抗体は、不活性支持体を、二次抗体と選択的に結合する標識付きの抗体もしくは抗体フラグメント（すなわち三次抗体）と接触させ、未結合の標識付き三次抗体を支持体から離し、次いで不活性支持体上の標識の存在を測定することによって確定することができる。酸性質を用いるサンドイッチ免疫検定法を使用するのが適切である。

また試料は、複合免疫検定法で試験することもできる。この場合、試験試料は標識を付けた試薬である抗体もしくは抗原と混合し、次いで抗（胎児制限抗原）抗体もしくは試薬の胎児制限抗原が付着している不活性支持体とともにインキュベートして、試験間に試料抗体との結合について結合を起こさせる。このような免疫検定法を達成する方法と手順は、免疫検定法の技術分野の著者によく知られている。最終的に、不活性支持体に付着しているか、または標識中に残っている標識を測定する。

抗（胎児制限抗原）抗体は、胎児制限抗原域、好ましくは高度に精製した胎児制限抗原から、通常の抗血清法またはモノクローナル法で得ることができる。本発明は、本願では、明確にするために、胎児制限抗原としての胎児フィブロネクチンの検出について述べるが、これには限定されることなく、いずれの胎児制限抗原の検出法も本発明の適用範囲内にあることを意味する。胎児フィブロネクチンは、Engvall and Ruoslahti, *Int. J. Cancer*, 20巻, 1~5頁, 1977年に記載されているようにして牛水から精製される。抗（胎児フィブロネクチン）抗体は、胎児フィブロネクチンから、通常の抗血清法またはモノクローナル抗体法によって試験することができる。

モノクローナルとポリクローナルの両方の抗（胎児制限抗原）抗体、または抗（胎児制限抗原クラス）抗体類は、胎児制限抗原域、

好ましくは高度に精製された抗原域から、通常の抗血清法またはモノクローナル法で試験することができる。

本発明の検定法に有用な主要な抗体は、抗体のIgG とIgM であるが、抗体のIgD, IgE およびIgA も充分な量で入手であれば使用できる。使用時これらの抗体は、Mishell and Shlissel, *SELECTED METHODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY*, San Francisco Prentice, 1980年; Geddes, J., *HOMOCLONAL ANTIBODIES : PRINCIPLES AND PRACTICE*, New York : Academic Press, 111~114頁, 1983年およびPerle et al, *EP* (1985年8月26日) に記載されているような通常のアフィニティーカロマトグラフィーを用いてアフィニティー精製される。

本発明のキットと方法に使用するのに適した優先的に結合する抗体フラグメントは、それぞれのモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体から、通常の酵素的または化学的フラグメント化法によって製造することができる。適切な方法は、例えばTijssen, P., *LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY : PRACTICE AND THEORIES OF ENZYME IMMUNOASSAYS*, New York : Elsevier 1985年に記載されている。

ポリクローナル抗（胎児制限抗原）抗体は、ウサギ、モルモット、ラットまたはヤギのような動物を、胎児フィブロネクチンのような胎児制限抗原の過剰物で免疫化し、その免疫化された動物から血清を取り出し、次いで例えば硫酸アンモニウム沈降によって血清から免疫グロブリン類を分離することによって得ることができる。

アフィニティーカロマトグラフィーに用いるのに適切な吸収剤としては、胎児制限抗原の抗体が共有結合する低糖アルガロースと類似のポリアクリルアミド凝胶が挙げられる。成人フィブロネクチンと交差反応を行う抗体を除くために、抗体の血清は、成人フィブロネクチンを結合させるカラムを通過させる。残留抗体を含有する溶液を

一部を次いで胎児フィブロネクチンのカラムを通過させ、次いで溶離してアフィニティ精製がなされた抗体を得ることができる。

これらの手順では、リン酸緩衝食塩水溶液による抗体溶液をカラムに加え、次いでその抗体を2.5M NaSCN溶液pH8.0で溶離することができる。所望により、抗体の濃度は、過剰透析法もしくは蛋白質濃度によって実施することができる。抗体の濃度は4以下以下の濃度では安定である。所望の分離と純度が得られるまでカラム分離法を繰り返し続ける。

胎児フィブロネクチン抗原と抗体類を製造するために、B. Rotta and S. Nakamori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82巻, 6517~6521頁, 1985年に記載されている手順を、その種類フィブロネクチンの代わりに胎児フィブロネクチンを用いて実施してもよい。最も好ましい抗（胎児フィブロネクチン）抗体は、the American Type Culture Collectionに登録番号ATCC HB 9019で登録され、1990年1月16日付けてRottaらに付与された米国特許第4,894,326号に詳細に記載されているハイブリドーマによって製造される。そのモノクローナル抗体はFDC-6と命名されている。上記ハイブリドーマの培養と、免疫検定法に使用する抗体の製造については実施例で詳細に述べる。

ポリクローナルとモノクローナルの両方の抗体の抗（胎児制限抗原クラス）抗体は一般によく知られており、市販されているか、または公けて入手できるハイブリドーマの販売品から入手できる。例えば抗（フィブロネクチン）モノクローナル抗体類は、ATCC HB 91 (American Type Culture Collection, Rockville MD米国) 由来のクローン試料から試験することができる。他のこのような抗体類は、日本特許登録60091266号 (DIALOG database file 35), WPI Acc. No. 85-161617/27 および米国特許第4,325,857号に記載されている。ポリクローナル抗フィブロネクチン抗体類をヤギとウサギ中に製造

する好ましい手順は実施例で述べる。

サンドイッチ免疫検定法：試料中の胎児制限抗原を測定する本発明のサンドイッチ法の実施例では、抗（胎児制限抗原）抗体に付着させた不活性支持体を、水性緩衝液で希釈した試験試料と充分な時間接触させて、試験試料中の胎児制限抗原を、不活性支持体上の抗（胎児制限抗原）抗体と結合させ、次いで支持体から試料が取出される。適切な免疫検定法の濃度は公知であり、pHが6~8好ましくは7.2~7.6のリン酸緩衝液 (PBS) のような緩衝液が挙げられる。試料は、先に述べた試料用吸収液で希釈する方が好ましい。インキュベーション時間は実質的な結合を起させるのに充分な時間でなければならず、その時間は温度依存性である。適切なインキュベーション時間は18~40℃の範囲内の温度下で30~240分間であり、好ましい接触時間は20~26℃の範囲の温度下で少なくとも60分間である。

次に残留試料溶液を、リンス液を用いて支持体から取出す。通常のリンス液を使用することができる。適切なリンス液は米国特許第4,528,267号に記載されている。そのリンス液は、リン酸塩のモル濃度が0.0001~0.05で、pHが6~8で、0.001~0.1モルの非イオン界面活性剤を含有する水性リン酸緩衝液である。適切な非イオン界面活性剤としては、ポリオキシエチレンエーテル類 (ラウリル、セチル、オレイル、ステアリルおよびトリデシルのポリオキシエチレンエーテル類のようなBEIJ) ; ポリオキシエチレンソルビタン類 (ポリオキシエチレンソルビタールのモノラウレート、モノバウミート、モノステアレート、モノオレエートおよびトリオレエート) ; および他のポリオキシエチレンエーテル類 (例えばBETTER) が挙げられる。好ましい非イオン界面活性剤としては、40のエチレンオキシド単位を有するオクタルフェノキシオキエトキシ

エタノール (19110H E-405, Rohm and Haas Company) およびボリオキシエチレンソルビタルモノラウレート (Tween 20, Sigma Chemical Company から市販されている) がある。最も好ましいリンス溶液は、0.02M トリス、0.08M 塩化ナトリウム、0.05% Tween-20 および 0.02% アジ化ナトリウムを含有する溶液である。

次に不溶性支持体を、その支持体上の標識された胎児制限抗原と結合する抗体、すなわちサンドイッチング抗体と接触させる。このサンドイッチング抗体は、抗 (胎児制限抗原) 抗体でもよく、または抗 (胎児制限抗原クラス) 抗体でもよい。このサンドイッチング抗体は標識付きまたは標識なしでもよい。標識なしのサンドイッチング抗体を使用する場合は、サンドイッチング抗体と結合し、かつ物理的に検出可能な標識を有する三次抗体を通常の方式で用いてサンドイッチング抗体を測定することができる。

ここで各種の標識について述べる。明確にするために、限定することなく、工程の次のステップでは、酵素、好ましくはクロモゲン性もしくは蛍光性の酵素で標識をつけた抗 (胎児制限抗原) 抗体について述べる。“クロモゲン性酵素”という用語は、本項では、適切な基質によって発色團産物を生成する酵素を意味する定義する。“蛍光性酵素”という用語は、本項では、適切な基質によって発光性團産物を生成する酵素を意味する定義する。

上記のサンドイッチング抗体は、水溶液で不溶性支持体に加える。その溶液は、反応物を保護し、結合反応を容易にするに適した濃度と保存剤を有する方が好ましい。例えばその溶液は、ウシ血清アルブミン (BSA)、リン酸緩衝液 (PBS)、および上記のリンス溶液中に用いたボリオキシエチレンソルビタンエステルのような親和性界面活性剤を含有していてもよい。酵素結合抗体に対する好ましい保存剤は、0.05M トリス緩衝液 pH 7.2、2% D-ソルビトール。

りに記述されている。支持体は  $10^{-1}$  ~  $10^{-11}$  モル濃度の基質を有する基質水溶液と接触させる。 $10^{-1}$  ~  $10^{-11}$  の基質のモル濃度が好ましい。基質溶液に添加する好ましい試薬と保存剤としては例えば 2-アミノ-2-メチル-1-ブロバノール緩衝剤と塩化マグネシウムがある。

上記の基質溶液は、発光性團もしくは発色團を生成する反応が起るのに充分な時間、不溶性支持体とともにインキュベートする。18 ~ 40℃ の温度下で、5 ~ 240 分間のインキュベーション時間を使用できる。20 ~ 25℃ の範囲内の温度と 10 ~ 90 分間のインキュベーション時間が好ましい。

次に溶液中の発光性團もしくは発色團のレベルを測定する。基質溶液中の発光性團もしくは発色團のレベルを測定するのに用いる装置と手順は、当該技術分野で従来用いられているものと同じである。溶液中の発光性團もしくは発色團のレベルは、不溶性支持体上の酵素濃度の函数であるが、この酵素の濃度は既に試験試料中の胎児制限抗原の量の函数である。試験試料中の胎児制限抗原の濃度は、上記溶液中の発光性團もしくは発色團のレベルを、既知の濃度の胎児制限抗原を含有する対照溶液で得られたそれぞれの発光性團もしくは発色團のレベルと比較することによって測定することができる。バックグラウンドとは統計学的に有意に異なる濃度の胎児制限抗原を含有する対照を用いることが好ましい。胎児フィブロネクチンについては、対照は、既知濃度の胎児フィブロネクチンを含有する半水でもよい。その半水は、所望により、使用する前に精製してよい。その胎児フィブロネクチンの濃度は、約 1 ~ 約 1,000 ng/ml の間を実験してもよく、好ましくは約 10 ~ 100 ng/ml で最も好ましいのは約 50 ng/ml である。対照の吸光度よりも大きいかまたは等しい吸光度を有する試料は陽性とみなされる。好ましいサンドイッチ検定法に

2% BSA、0.1% アジ化ナトリウム、0.01% Tween-20、1% 塩化マグネシウム、および 0.1% 塩化亜鉛からなる緩衝剤である。

インキュベーションは、サンドイッチング抗体を、存在している場合に不溶性支持体に付着している露出胎児制限抗原のエピトープと結合させるのに充分な時間続ける。好ましいインキュベーションの時間と温度は、不溶化試薬の抗 (胎児制限抗原) 抗体と試験試料の胎児制限抗原との結合について先に述べたのと同じである。

次にサンドイッチング抗体溶液を不溶性支持体から除き、次いで支持体を先に記述したようなリンス溶液ですすぎ残っている未結合物質を除く。

サンドイッチング抗体に標識を付けていない場合、サンドイッチング抗体と適度に結合する、時々で標識を付いた抗体などの結合試薬を、水溶液にして、不溶性支持体に加える。その溶液は、反応物を保護しつつ上記のような結合反応を容易にする適切な濃度と緩衝剤を含む方が好ましい。インキュベーションは、標識を付いた抗 (サンドイッチング抗体) 抗体が、存在している場合不溶性支持体に付着しているサンドイッチング抗体の露出エピトープと結合できるように充分な時間続ける。好ましいインキュベーションの時間と温度は、不溶化試薬の抗 (胎児制限抗原) 抗体と試験試料の胎児制限抗原との結合について述べたのと同じである。

次に標識を付いた抗体溶液を不溶性支持体から除き、次いでその支持体を上記のようなリンス溶液でリンスし、残留している未結合の未標識物質を除く。

次のステップでは、不溶性支持体を、酵素の存在下で反応を受けた基質の水溶液と接触させて、溶液中に蛍光化合物またはクロモゲン化合物を放出させる。適切な基質と、その基質を変換させることができる酵素とは、例えば米国特許第 4,190,496 号と同第 4,528,267

ついては実施例で詳細に述べる。

サンドイッチ法は、胎児制限抗原クラス結合抗体を、標識抗体または好ましくはサンドイッチング抗体として用いるために改変することができる。これらの実施形態では、抗 (フィブロネクチン) 抗体のような抗 (胎児制限抗原クラス) 抗体を不溶性支持体に付着させ、次に標識付きもしくは標識なしの抗 (胎児制限抗原) 抗体をサンドイッチング抗体として加える。好ましくは、抗 (胎児制限抗原) 抗体は不溶性支持体に付着させ、標識付きもしくは標識なしの抗 (胎児制限抗原クラス) 抗体は標識抗体をサンドイッチするのに用いる。

メンプラン免疫検定法：試験試料中の胎児制限抗原を測定する本発明のメンプラン法の実施形態では、抗 (胎児制限抗原) 抗体を付着させた不溶性支持体を、試料中の胎児制限抗原と不溶性支持体上の抗 (胎児制限抗原) 抗体とを結合させるのに充分な時間、pH が 8 ~ 9 の好ましくは 7.2 ~ 7.6 のリン酸緩衝液 (PBS) のような水性緩衝液で洗浄した試験試料と接触させる。結合させるのに必要な時間は、流動系では非常に短い。適切なインキュベーション時間は、16 ~ 40℃ の範囲内の温度下で 1 秒 ~ 20 分間で、好ましい接触時間は 1 分間より短く、10 秒 ~ 2 分間が最適である。

次に不溶性支持体を、不溶性支持体上の標識された胎児制限抗原と結合する抗体、すなわちサンドイッチング抗体と接触させる。このサンドイッチング抗体は標識付きまたは標識なしでもよい。標識なしのサンドイッチング抗体を使用する場合は、このサンドイッチング抗体と結合しつつ物理的に測定可能な標識を有する三次抗体を、通常の方式で用いてサンドイッチング抗体を測定することができる。

ここで各種の酵素について述べる。明確にするため、限定することなしに、酵素好ましくは蛍光性もしくはクロモゲン性の酵素

特表平6-503645 (7)

で標識を付けた抗体（胎児制限抗原）抗体について、工程の次のステップを説明する。

サンドイッチング抗体は、水溶液で、不溶性支持体に加える。その溶液は、反応物を保護し結合反応を容易にする適切な塩類と緩衝剤類を含有している方が好ましい。例えば緩衝液は、ウシ血清アルブミン（BSA）リン酸緩衝液（PBS）、および上記のリンス溶液中に用いたポリオキシエチレンソルビタンエステルのような親和な界面活性剤を含有していてもよい。インキュベーションは、サンドイッチング抗体が、存在している場合に不溶性支持体に付着している胎児制限抗原の露出エピトープと結合するのに充分な時間続ける。好ましいインキュベーションの時間と濃度は、不溶化試薬の抗体（胎児制限抗原）抗体と、試験試料の胎児制限抗原との結合について述べたのと同じである。

サンドイッチング抗体の溶液は不溶性支持体から任意に除去してもよく、その支持体は前記のようなリンス溶液ですぐに、残留している未結合の標識付き物質を除去する。

サンドイッチング抗体が標識なしの場合は、サンドイッチング抗体と選択的に結合する、酵素で標識を付けた抗体などの結合試薬を、水溶液で不溶性支持体に加える。その溶液には反応物を保護し結合反応を容易にする適切な塩類と緩衝剤類を含有している方が好ましい。例えば緩衝液は、ウシ血清アルブミン（BSA）、リン酸緩衝液（PBS）、および前記のリンス溶液に用いたポリオキシエチレンソルビタンエステルのような親和な界面活性剤を含有していてもよい。インキュベーションは、標識を付けた抗体（サンドイッチング抗体）抗体が、存在している場合に不溶性支持体に付着しているサンドイッチング抗体のエピトープと結合できる充分な時間続ける。好ましいインキュベーションの時間と濃度は、不溶化試薬の抗体（胎児制限

抗原）抗体と、試験試料中の胎児制限抗原との結合について先に述べたのと同じである。

次に標識を付けた抗体の溶液を不溶性支持体から除去し、次いでその支持体を先に述べたようなリンス溶液ですぐに、残留している未結合の標識付き物質を除去する。

本発明のノンプランサンドイッチ法の次のステップでは、不溶性支持体を、酵素の存在下で反応を受ける器質の水溶液と接触させて、溶液中に呈色性化合物もしくは色原性化合物を放出させる。適切な基質および基質を変換させることができる酵素ならびに追加の成分と緩衝剤は先に述べたとおりである。

基質の溶液は、発色剤もしくは発色團を生成する反応を起こすのに充分な時間、不溶性支持体とともにインキュベートされる。18～40℃の温度下で、1～20分間のインキュベーション時間を使用できる。好ましくは温度は20～26℃の範囲内で、インキュベーション時間は2～5分間である。ノンプラン上の発色原体と色原体のレベルは反射率計または濃度計を用いて測定することができる。

別のノンプラン法の実施基準では、抗体（胎児制限抗原）抗体をノンプランと結合させる。試料と、標識を付けた抗体（胎児制限抗原クラス）抗体とを混合する。抗体が結合するのに充分な時間が経過してから、試料ノン結合体の溶液を上記ノンプランと接触させる。試料中の胎児制限抗原は抗体（胎児制限抗原）抗体と結合して、ノンプラン上に抗体（胎児制限抗原）抗体／胎児制限抗原／標識付き抗体（胎児制限抗原クラス）抗体のタンドイッテを生成する。好ましい実施基準では、標識はコロイド金である。

競争免疫検定法：標識を付けた試薬の胎児制限抗原を用いる本発明の競合法の実施基準は、試験試料と、標識を付けた試薬の胎児制限抗原との混合物を、不溶性支持体に付着させた抗体（胎児制限

抗原）抗体と接触させ、次いで不溶性支持体と結合するかまたは溶液相中に残る標識の量を測定することからなる方法である。

標識を付けた抗体（胎児制限抗原）抗体を用いる本発明の競合法の実施基準には1種以上の形態がある。不溶性支持体に結合させた抗体（胎児制限抗原）抗体を用いる1つの実施基準は、試験試料と、標識を付けた抗体（胎児制限抗原）抗体との混合物を、不溶性支持体に付着させた抗体（胎児制限抗原）抗体と接触させ、次いで不溶性支持体と結合するか、または溶液相中に残る標識の量を測定することからなる方法である。不溶性支持体に結合させた試薬の胎児制限抗原を用いる他の実施基準は、試験試料と、標識を付けた抗体（胎児制限抗原）抗体との混合物を、不溶性支持体に付着させた胎児制限抗原と接触させ、次いで不溶性支持体と結合するか、または溶液相中に残る標識の量を測定することからなる方法である。

これらの各方法では、試験試料を緩衝液で希釈し、インキュベートし、次いで標識を、サンドイッチ免疫検定法の実施基準について先に述べたのと同じにして測定する。制限試薬の濃度は、試薬間で結合結合を行うことができるように選択され、不溶性支持体上または溶液中に残留する標識の量は、試験試料中の被検体の量の間数の函数である。これらの方法は一般に公知であり、その方法を変更して手順を最適化する方法は、免疫検定法の技術分野の当業者には充分に知られている。

また抗体（胎児制限抗原）抗体と、試験試料中の胎児制限抗原との結合は、抗体（胎児制限抗原）抗体が試料中の胎児制限抗原によって付着している粒子の量、抗体抗原反応による抗体の状態、または抗原と抗体が結合する際に起こる物理的または電気的変化を半導体ブリッジプローブを用いて行う測定の結果、米国特許第4,647,544号に記載されているような光検査パターンなどによって測定するこ

とができる。

本発明の適用範囲内に含まれている、試験試料中の胎児制限抗原を測定するのに用いる胎児制限抗原試薬キットには、一般に、不溶性支持体に付着させた抗体（胎児制限抗原）抗体および抗体（胎児制限抗原クラス）抗体が入っている。好ましい実施基準では、抗体（胎児制限抗原）抗体はモノクローナル抗体であり、および抗体（胎児制限抗原クラス）抗体はポリクローナル抗体である。さらに好ましくは、抗体（胎児制限抗原クラス）抗体は酵素で好ましくはアルカリホスファターゼで標識を付けられている。本発明のキットには、さらに、酵素基質、陽性の対照、陰性の対照、リンス緩衝剤、または試料の適用用具のような1つ以上の試料調製用器具が入っていてもよい。

本発明のキットには、さらに、試験試料中の胎児制限抗原を測定するために下記のものを組合せて入れてもよい。すなわち、試料の移動、酵素および第4に用いる緩衝剤；バイアルびん、キル容器などの本発明の試薬の容器；割合のバイアルびんなどの容器に入った酵素基質の試薬のようないかの任意の試薬；抗体と抗原の結合の存在と程度を測定するための簡便的もしくは光学的測器；およびこれらを組合せたものである。サンプリング用スワップのようなサンプリング用具および移動用と酵素用の緩衝剤も入れてもよく、または別個に包装されていてもよい。キットの他の部材はバイアルびん、ホイル容器などの容器のような便利な形態のものに入れられていてもよい。例えばホイル容器中の不溶性支持体標識物は、バイアルびんなどの容器に入った他の試薬と組合わすことができる。キットの液体試薬の量も好ましい容器は、適切な量例えば50mlもしくは100mlの液槽を正確に放出するポリエチレン製ドロッパーポトル容器である。好ましいキットについては実施例で詳細に述べる。

## 特許平6-503645 (B)

### 胎児特異抗原による妊娠検査

妊娠診断の具体的な内容は、胎児または母体に抗体をもつたは特異成分である胎児特異抗原の検出により構成されており、試験は常に子宮頸管または子宮頸管口の近くより採取する。本発明者らは、これらの成分が妊娠後20週の間にこれらの試験中に存在することを発見した。一方母体血液中には、胎児特異抗原の有意な量は存在していないので、試験試料中の母体血液の存在は本発明の試験方法を妨害しない。

試験は上述のように行われ、試験試料中に胎児特異抗原の存在を示す結果が得られた場合は妊娠を意味する。

### 子宮外妊娠の診断

子宮外妊娠を診断する本発明の方法は、子宮頸管または子宮頸管口の近くで採取した試験試料中の胎児特異抗原の、存在の有無検出により構成されている。これら成分の検出可能な量は、正常妊娠の20週の間に採取されるこれらの試験試料中に正常に存在する。妊娠20週の間に採取したこれら試験試料中に胎児特異抗原が存在しない場合は、子宮外妊娠のあることを意味する。胎児特異抗原は母体血液中に有意な量は存在しないので、試験試料中に母体血液が存在することは、本試験法を妨害しない。

試験試料は子宮頸管と子宮頸管口の両者又は頸管口近くで採取され、その試料は上述のように、試験中の胎児特異抗原の存在、またはその量を確定するため試験される。一方、血液または尿中の妊娠表示ホルモンの存在性検査により妊娠を判定することが望まれるかも知れない。これに因連して広範囲の方法が、試験対象女性の血液または尿を用いて妊娠を診断する分野の熟達者に知られている。使用できる方法はいずれも使用可能である。例えば、血型、血液、な

ど、尿、パープルまたはクロロフェノール・レッド添加法)、ヨード試験紙法 (U. S. Patent 3,248,173)、他の尿液添加法 (U. S. Patent 3,278,270)、酸と食塩の混合物で女性の血液を処理する方法 (U. S. Patent 3,883,304) があげられる。妊娠は、U. S. 出願 No. 121,902 (filed : November 17, 1987) の特許の方法にしたがい、子宮頸管または子宮頸管口の近くで採取した試験試料を用いる検査法も可能性がある。上述の方法はいずれも使用可能であるが、hCG を測定するような方法が望ましい。

妊娠後20週の間の試験試料で、胎児特異性抗原が陽性結果を示しているのに妊娠しているとの結果がある際は、子宮での正常な妊娠でなく、子宮外妊娠が起きていることを示している。

### 受精に伴う生成成分の生体外 (ex vivo) 試験

受精に伴う生成する成分を生体外で試験する本発明の内容は、導入される自然妊娠により生成、または子宮内膜剥離術または治療的剥離処理を行っている際に、抽出される試料についての胎児特異性抗原の検出により構成される。胎児特異性抗原は母体の血液中には有意な量は存在しないので、試験試料中に母体の血液が存在することで、本試験方法は妨害されない。

豆乳に伴う生成する成分の生体外での存在を検定する試験試料は、子宮から排出される成分を代用すると考えられているものを入手することができる。この様な試料は、治療的剥離または子宮内膜剥離術等で中に抽出される生体組織である。

或いは、その試験試料は、自然妊娠または剥離の微細と考えられている細胞出物であることがある。試験試料は一般に生体組織と細胞子宮細胞の両者から構成されている。また試料は、生体組織、膜または子宮頸管粘液、他の膜または子宮頸管分泌物、細胞または

らびに尿中、または尿中に尿中のhCG を測定する方法の特許としては、U. S. Patent に、3,171,783, 3,234,096, 3,236,732, 3,298,787, 3,309,276, 3,485,751, 3,655,838, 3,689,633, 3,862,302, 3,873,682, 3,783,683, 3,833,304, 3,991,175, 4,003,988, 4,014,553, 4,016,250, 4,033,723, 4,071,314, 4,094,963, 4,123,224, 4,123,509, 4,138,214, 4,208,187, 4,210,723, 4,234,561, 4,256,629, 4,268,435, 4,270,923, 4,310,455, 4,313,871, 4,320,111, 4,348,207, 4,371,515, 4,419,453, 4,421,896, 4,493,793, 4,508,829, そして 4,665,034 がある。その他の妊娠検査法としては、次記のものがある。即ち、尿中 (U. S. Patent 3,141,740) または人乳、血液、または血液中 (Hungary Patent No. 137028, WPI No. 86-023344/04) のプロゲステロン代謝物の測定；血液または血清中 (U. S. Patent 3,892,841, 4,371,515, ならびに 4,493,793) のヒトの胎盤のラクトゲンの測定；尿中のエストロジエンステロイド類の測定 (U. S. Patent 3,955,928)；血液、血漿または尿中 (U. S. Patent 4,016,250, 4,094,963, ならびに 4,320,111) の質化ホルモン (LH)、プロラクチン (PRL)、そしてまたはhCG 代謝物質の測定；妊娠時特有のα-1 締蛋白 (U. S. Patent 4,065,445 ならびに 4,191,633) の測定；LH の測定 (U. S. Patent 4,138,214 ならびに 4,208,187)；ウシの血清または尿中のウシの妊娠抗原の測定 (European Patent 出願 189,551, WPI No. 86-042108/06)；新規な胎盤蛋白質の測定 (U. S. Patent 4,592,863) ならびに、早期妊娠因子 No. 8605498 の測定 (WPI No. 86-264940/40) などによる妊娠の診断法があげられる。さらに、その他の妊娠を診断する方法としては、尿に安料を添加する方法 (U. S. Patent 2,587,221 ならびに 3,226,198 でのジニトロフェニルヒドラジン添加法)；U. S. Patent 3,595,620, プロモクレ

細胞断片、羊水、胎児または母体の他の成分などを含有している。一方この試料は胎盤から、グリコランや他の粘液状の先端を備えた線維、アスピリーター、吸引装置、洗浄装置、その他の医療機器などを用いて採取することが出来る。またこの試料は、子宮内膜剥離術、治療的剥離術等で中に抽出される生体組織を代表しており、剥離される自然妊娠の場合には、女性の医療用のため物を用いて手に入れる事もできる。試験試料は上述のように、感受性の高い蛋白系試験物を保護する被膜中に包囲していることが重要な点である。

胎児特異性抗原の検出は上述の方法により行うことができる。妊娠の診断にあたっては、血液または尿中の妊娠表示ホルモンの有無検査を追加して行うことが望まれる。子宮外妊娠に関連して前述したような方法も含め、信頼できる方法は、いずれも使用可能である。

子宮内膜剥離術、治療的剥離、結合される自然剥離 (後庭) の剥離される試験試料は、胎児特異性抗原の有無の検査用に使用することができる。妊娠の存在があり、治療的または自然剥離を代表していることが期待される試験試料中の胎児特異性抗原の結果が陰性になることが同時に起きた場合は、妊娠があった信頼度で、検査は終了する。妊娠の存在があり、治療的または自然剥離を代表することが期待されている試験試料中の胎児特異性抗原の結果が陽性になった場合は妊娠があった信頼度で、この場合は検査は打ち切る。妊娠インディケーターならびに、子宮内膜剥離術等で中に得た試験試料中の胎児特異性抗原の結果の両者が不存在の結果となつた場合は、妊娠には適していないという結果で、また妊娠も持っていないかったということである。

### 早産の危険／破裂膜試験

早産の危険増大を示すための本特許の内容は、妊娠20週後の試験

試料中の胎児特異性抗原の検出を含めている。本発明者は、これら成分の検出可能な量は、妊娠20週後の後膜円盤、子宮頸管、子宮頸管口の付近から得たもの等の胎試料には一般に存在しない。妊娠20週後に採取した試料中に、これら成分の検出可能な量が存在することは、切迫早産の危険増大を示すと共に、または羊膜破裂の危険を示している。胎児特異性抗原は母体血漿中には有意な量は存在しないので、試験試料中の母体血漿の存在は本試験法を妨害しない。

試験試料は、後膜円盤、子宮頸管、子宮頸管口の付近から採取され、検試料は前述の様に試料中の胎児特異性抗原の存在、または量を検査するべく試験される。妊娠20週後の試験試料中に胎児特異性抗原の存在を示す結果が得られた場合は、羊膜破裂の可能性と、または早産の危険増大の危険である。

#### 不溶性阻体

本発明における抗原および抗体試験は従来の通常プロセスで不溶性阻体に結合させることができる。例えば、US PATENT 3,234,096, 3,236,732, 3,309,275, 3,873,683, 3,951,175, 4,003,988, 4,016,250, 4,033,723, 4,071,314, 4,348,207, 4,419,453 に記載されたような不溶性阻体への抗原類の結合用および、ラテックス粒子および赤血球に対する抗原の結合用に適した抗原結合法が利用できる。不溶性阻体に対する抗体の結合法は、例えば、US PATENT 3,551,555, 3,553,310, 4,048,298 および RE-29,474, さらに Tiljason 著 "PRACTICE AND THEORY OF ENZYME IMMUNO-ASSAYS", Elsevier Science Publishers, (1985) pp 297-326に述べられている。吸着によるポリスチレンに対する抗体の結合操作は、例えば、US PATENT 3,646,346 および 4,092,408 に述べられている。本発明の明確化および制限範囲を越えないことを目的として、抗体の不溶

性阻体類への結合に関する操作を以下に述べる。これらの操作は抗体試験、例えば、抗-(胎児特異性抗原)抗体試験のよう、および抗-(胎児特異性抗原)抗体、さらに、胎児特異性抗原のような抗原試験の不溶性阻体類への結合に適している。

抗体の不溶性阻体表面への結合および抗原の結合反応に対する妨害のことまたはその結合反応の存在およびその規模を決定するために利用できる開反応を優先的に考慮して、種々の材料を不溶性阻体として利用できる。天然および合成高分子の有機および無機性の高分子も不溶性阻体として利用できる。適当とされる高分子の例の中には以下の材料が含まれる: ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリブチレン、ポリ(4-メチルブチレン)、ブチルゴム、硅藻土性体混合物、ポリエチル酸、ポリアミド酸、セルローズおよびその誘導体(セルロース、ニトロセルローズおよびその誘導体等)、アクリル酸エチル酸、メタアクリル酸エチル酸、ビニル樹脂(ポリビニル酢酸、ポリ氯化ビニル、ポリビニリデンクロライド、ポリビニルフルオライド等)、ポリスチレン、ステレン-ジラフト共重合体樹脂、レイロン、ナイロン、ポリビニル醇酸、ポリフェルムアルデヒドなど、不溶性阻体として利用できるその他の材料としては上記高分子のラテックス樹脂、シリカゲル、シリコンウェーハー、ガラス、紙、不溶性蛋白、金属類、半金属類、金属酸化物、導性材料、半導体材料、セルロットおよび類似体を挙げることができる。さらに、蛋白類、ゼラチン類、リキド類、硅藻土類、アガロース、ポリアクリルアミド類のようなゲル形成物質、または致発の水和相を形成するデキストラン類、ポリアルキレンダリコール類(2-3の炭素原子を有するアルキレン基)または界面活性剤、例えばホスフォリビッドのような親水親油両性物質、長鎖(12-24の炭素原子を有する)アルキルアンモニウム塩類および類似体も含まれる。

本発明における好ましい不溶性阻体はナイロンおよびニトロセルローズ系膜から成る材料である。これに次ぐ不溶性阻体はスチレン、ステレン-アクリルニトリル共重合体のようなスチレン共重合体またはポリエチレンまたはポリアプロピレンのようなポリオレフィン類およびアクリル酸およびメタアクリル酸共重合物とその類似体から製造される材料である。本発明における最も好ましい不溶性阻体はナイロン膜またはポリスチレンマイクロホールプレートである。抗体試験または抗原試験は吸着、イオン反応、ファン・デル・ワールス吸着、静電気的または他の非共有結合的に不溶性阻体に結合でき、あるいは共有結合によつても不溶性阻体に結合可能である。

この処理において特に有利な阻体は複数の凹部を有するマイクロホールプレートの構成体である。凹部の表面またはプラスティックカップはその中に抗体または抗原を保持する構造となり得る。定量が蛍光測定を用いる必要があれば、マイクロホールプレートまたは凹部への感光によって、各部にも、光に対して、ある凹部に対して加えられた励起光が周辺の凹部の内部にまで到着または影響を及ぼさない程度に不透明となる。

非共有結合を利用する操作がUS PATENT 4,528,261 に記載されている。抗体と抗原が不溶性阻体と共有結合を行う操作を L. Chilizzi が INHOBILIZED ENZYMES, Holtzbrinck Press : New York (1978) に、および A. Contreras が J. Biol. Chem. 245 : 3059 (1970) に述べている。表面を蛋白で被覆し、例えばカッピング試験としてグルタルアルデヒドを利用するUS PATENT 4,210,418 に述べた操作を用いて、抗体または抗原と連結させることができる。

これに替わる処理として、凹部をポリエーテルイソシアネートのような過剰イソシアネート基を有する物質層で被覆し、そこへ水溶液中の抗体または抗原が与えられ、局的に結合させることができ

る。さらに別の処理では、US PATENT 3,720,760 に記載されているように、プロムシアン法によって抗体または抗原を水酸化された材料に連結させることもできる。

非特異的結合を防ぐために不溶性阻体を「ブロック」することが好ましい。適当な阻害剤の選択は不溶性阻体のタイプによって定まる。例えば、ポリスチレン系阻体類に適する阻害剤は水溶性非免疫性の動物蛋白を包含する。水溶性非免疫性の動物蛋白として仔牛血清アルブミン( BSA ) : ヒト、ウサギ、ヒツジ、およびウマ血清アルブミン : カゼインおよび豚血清ミルク : 血白アルブミン : 副蛋白質 : およびこれらの類似体が含まれる。最も好ましい阻害/安定剤組成は 4% ヒト、1% マンニトール、0.5% カゼイン、0.01% BSA である。

同様な阻害剤をナイロンおよびニトロセルローズ阻体類に対してても使用できる。しかし、ニトロセルローズおよびナイロン類似阻体類に対して好ましい阻害剤は脱脂ミルクまたはカゼインである。これらの類似阻体に最適な阻害剤は 1 ないし 5 重量% の脱脂乾燥粉乳またはカゼインおよびポリオキシエチレンソルビタン誘導体およびポリオキシエチレンエーテル類のような非イオン界面活性剤である。

#### 阻害化試験

本発明における胎児特異性抗原検出試験、抗-(胎児特異性抗原)抗体、抗-(胎児特異性抗原)抗体および抗-(テンドウウィッタ抗体)試験の操作は、蛋白に対する従来の脱脂粉乳化操作により、好ましくは阻体結合位置に適宜な阻害蛋白質を加えて、調製できる。

化学的または物理的な結合により蛋白試験は表面に結合または連結することができる。本発明の抗原または阻体類が共轭結合できるリガンドおよび原子団または配位子には、その試験が試験試料中で

特表平6-503645 (10)

化合物および材料から選別用に利用できる元素、化合物または生体材料が含まれる。

本発明の明確化および制限範囲を越えないことを目的として、以下に明確化操作を述べる。またここに述べる操作は、この妊娠抗原類または胎児特異抗原類のようなあらゆる蛋白性化合物または蛋白性物質に対しても一般に適用できるものである。

同位元素	純同位元素の比放射能 (キューリー/モル)	半減期
<sup>14</sup> C	$6.25 \times 10^1$	5720 年
<sup>3</sup> H	$2.91 \times 10^1$	12.5 年
<sup>35</sup> S	$1.50 \times 10^1$	87 日
<sup>33</sup> I	$2.18 \times 10^1$	60 日
<sup>32</sup> P	$3.16 \times 10^1$	14.3 日
<sup>31</sup> P	$1.62 \times 10^1$	8.1 日

本発明の放射性標識化抗体類は *in vitro* の状態は最も利用できる。標識される抗体の比放射能は半減期、放射性標識の同位元素的純度、および標識部位がその抗原または抗体に取り込まれる程度に基づいて決められる。表 A に数種の汎用同位元素とその比放射能および半減期を示す。一般に、インヒュノアッセイにおいては比放射能が高い程度でも改善される。

表 A に収載した放射性同位元素による抗体類の標識化は一般に熟知されている操作である。例えば、トリチウム標識法は US Patent 4,302,436 に記載されている。抗体に対し各に利用される技術。

同 類	表 B	同 類
ヒドロラーゼ	アミラーゼ	
スクレアーゼ	ポリスクレオチダーゼ	
アミダーゼ	アルギナーゼ	
ブリン デアミナーゼ	アデナーゼ	
ペプチダーゼ	アミノカリペプチダーゼ	
プロティナーゼ	ペプシン	
エストラーゼ	リバーゼ	
鉄酵素	カクテーゼ	
硝酸素	チロシナーゼ	
補酵素含有酵素	アルコール デヒドロゲナーゼ	
シトクローム蛋白酵素	コハク酸	
デヒドロゲナーゼ		
黄素酵素	ジアホラーゼ	
ムクーゼ	グリオキサラーゼ	
デスマラーゼ	アルドラーゼ	
オキシダーゼ	グルコース オキシダーゼ	
ペルオキシダーゼ	キースラディッシュ	
ホスファターゼ	アルカリ ホスファターゼ	
デヒドロゲナーゼ	酸性ホスファターゼ	
キスホリラーゼ	GGPDB(グルコース 6- キスホデヒドロゲナーゼ)	
ヘキソキナーゼ	β-ガラクトシダーゼ	

トリチウム標識化および <sup>35</sup>S 標識化について Golding が J. MONOCLOSTRAL ANTIBODIES : PRINCIPLE AND PRACTICE, New York : Academic Press (1983) pp. 124-126 に述べ、また参考文献もその中に引用されている。抗体類の汎用化のその他の操作は Hunter および Greenwood が, Nature, 195 : 945 (1962) に、David らが Biochem. J. 12 : 1014-1021 (1974) に述べている。また US PATENT 3,867,517 および 4,376,110 にも記載されている。適切なシステム、連続操作の例およびそれに付随する基質の反応は、例えば、US PATENT RE-31,006, 3,654,090, 4,216,048, 4,289,747, 4,302,438, 4,312,943, 4,376,110 に記載され、その中に参考文献も引用されている。その他の適切なシステム例は Peace らが Clin. Chem. 20 : 353-359 (1974) に、Midean, E. が Clin. Chem. 22 : 1243 (1976) に述べている。

適切な標識化に利用できる酵素類および各類別の特異的な例を以下に示す：

適切な酵素は、Bach et al. PRACTICAL PHYSIOLOGICAL CHEMISTRY, New York : McGraw-Hill pp. 306-397 (1954) に記載されている。

蛍光素及び色原性酵素（選択された基質が蛍光又は色原性生成物を生成するであろうものの存在下での酵素）は、有用なラベリング成分である。抗原と結合する抗体の能力を認めないで抗体に酵素を選択的に結合し、そしてタンパク質性抗原に酵素を結合するための方法は各業界において良く知られている。

適切な酵素及び抗体にそれらを結合するための方法は、I. Chibata, Immobilized Enzymes, Halsted Press : New York (1978) ; A. Costecrescas, J. Bio. Chem. 245 : 3059 (1970) ; Wilson, R. C. など, International Conference on Enzyme Fluorescence and Related Staining Techniques, W. Kessy など, 廣葉社, Amsterdam : Elsevier pp. 215-244 (1978) ; Sullivan, R. など, Ann. Clin. Biochem. 16 : 221-240 (1979) ; Nygren, B. など, Med. Biol. 57 : 187-191 (1979) ; Gadkari, D. など, J. Virol. Methods. 10 : 215-224 (1985) ; Tilanus, P. など, Anal. Biochem. 136 : 451-457 (1984) ; Taurito, J. など, J. Biotechnol. Glycogen. 33 : 767-777 (1985) ; Ishikawa, E. J. Immunology 4 : 209-327 (1983) ; 及びアメリカ特許第 4,190,496 号により記載される。

好ましい酵素及びそれに対応する適切な基質は、ホースラディシペルオキシダーゼ及びこのための適切な基質である。-フェニレンジアミン、-フェニレンジアミン、-ジアミン、及び 4-クロロ-4-オナフトールである。それらはまた、β-ガラクトシダーゼ及びそれに対応する適切な基質である 4-メチルウンベリフュリル-β-D-ガラクトシド、D-ニトロフェニル-β-D-ガラクトース、D-ニトロフェノール、D-ニトロフェニル-β-D-ガラクトース及び D-ニトロフェノールを含む。それらは、

特表平6-503645(11)

アルカリホスファターゼ及びそれに対応する適切な基質であるジエトロフェニルホスフェート、インドキシルホスフェート及び5-ブロモ-3-クロロインドキシルホスフェートを包含する。更っても好ましい酵素基質の組合せは、アルカリホスファターゼ及びフェノールフタレインキノホスフェートである。

抗体を酵素ラベリングするための適切な方法の例は、カルボジイミド、ジアルテヒド及び二官能基カッピング試薬の使用を包含する。アミド基を通過しての酵素の結合は、無水酢酸、たとえばジメチルカルボアミド、ジオキサン、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン又は同様のものにおいて、環化チオニル、N-ヒドロキシスクシニミド又は類似する状態によりタンパク質を処理することによって達成される。他のカッピング剤は、カルボジイミド、たとえば1-エチル-3-(3-(N,N'-ジメチルアミノ)プロピル)、カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(2-メルキノエチル)カルボジイミドメチル-2-トルエンスルホネート、スクシニミジル-4-(N-メレイミドエチル)シクロヘキサン、1-カルボキシレート及びスクシニミジル-3-(2-ビリジルジオ)アロビナメートを包含する。

酵素の蛍光化物成分はまた、アルデヒドに酸化され、そして免疫グロブリンのリシルアミノ基と反応され、シップ基が形成される。環状水素化ナトリウムによる還元は、酵素及び抗体の適切な結合をもたらす。キースラディッシュペルオキシダーゼ及び抗体は、Milten, K.など、International Conference on Issues of Fluorescence and Related Staining Techniques, W. Kaappなど、編著者、Amsterdam: Elsevier pp 215-244 の方法により、免疫グロブリンに効果的に結合され得る。

螢光团及び免色团によりラベルされた抗体は、当業界において知

られている程度の蛍光成分から選択され得る。抗体及び他のタンパク質は、約310 nmまでの波長を有する光を吸収するので、蛍光成分は、約310 nm及び好みしくは約400 nmの波長で実質的な吸光性を有するように選択されるべきである。

種々の適切な螢光体及び免色体は、Stryer, Science 162: 526 (1968) 及びBrand, L.など、Ann. Rev. Biochem. 41: 843-868 (1972) により記載される。抗体は、従来の方法、たとえばアメリカ特許第3,940,475号、第4,289,747号及び第4,375,310号に開示される方法により螢光発光团グループによりラベルされ得る。

上記の所望する多くの性質を有する螢光体の1つのグループは、キサンチン色素であり、これは3-,6-ジヒドロキシ-3-フェニルキサンチドロール及びレチシンに由来するフルオレセイン及び3-,6-ジアミノ-9-フェニルキサンチドロール及びリスサニムロダミンBに由来するロダミンを包含する。9-0-カルボキシフェニルキサンチドロールのロダミン及びフルオレセイン試薬体は、9-0-カルボキシフェニル基を有する。反応性カッピング基、たとえばアミノ及びイソチオシアネート基を有するフルオレセイン化合物、たとえばフルオレセインイソチオシアネート及びフルオレセインは容易に入手できる。

螢光化合物のもう1つのグループは、又はD位置にアミノ基を有するナフチルアミンである。ナフチルアミノ化合物の中には、1-ジメチルアミノナフチル-5-スルホネート、1-アニリノ-8-ナフタレンスルホネート及び2-アートルイジニル-6-ナフタレンスルホネートが包含される。他の色素は、3-フェニル-7-イソチオシアネートクマリソ、アクリジン、たとえば9-イソチオシアネートアクリジン及びアクリジンオレンジ; N-(p-(2-ベンズキサゾリル)フェニル)マレイミド、ベンゾキサゾリル、た

とえば4-クロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール及び7-(2-メトキシベンジルアミノ)-4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール: スチルベン、たとえば4-ジメチルアミノ-4'-イソチオシアネート-スチルベン及び4-ジメチルアミノ-4'-マレイミドスチルベン; N, N'-ジオクタデシルオキサカルボキシアミン-2-トルエンスルホネート: ピレン、たとえば8-ヒドロキシ-1,3,6-ビレントリスルホン酸、1-ビレン酸、メロシアニン540、ローズベンガル、2,4-ジフェニル-3(2H)-フラン、2-フタルデヒド、及び他の容易に入手できる蛍光成分を包含する。これらの色素は、活性官能基を有し、又はそのような官能基は容易に導入され得る。

抗体は、Goding, J., Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, New York: Academic Press (1983) pp 208-249 により記載される方法によりフルオロクロム又は免色团によりラベルされ得る。フルオロクロムの濃度は、Goding, 前記, P229の表に従って選択される。たとえば、DHSOにおけるフルオレセインイソチオシアネート(1.0 mg/ml)又はローダミンイソチオシアネート(10.0 mg/ml)が選択され、そして所望する体積(合計のタンパク質濃度体積の1-10%)が、操作されながら、タンパク質溶液に滴下される。反応は2時間進行し、先から遮断される。生成物は、0.1%のNaNO<sub>2</sub>を含むPBS中、SEPHADEX G-25ゲル上でのゲル通過により精製され、本反応又は加水分解されたフルオロクロムが分離される。接合体の吸光度は280 nm及び可視領域におけるそのピーク(フルオレセイン化された抗体のために495 nm及びローダミン化された抗体のために550 nm)で測定される。フルオロクロム: タンパク質の比は、Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, New York: Academic Press (1983) pp 224-225 の方法に従って計算される。

接合体は、使用まで保護するために1%で貯蔵される。抗体接合濃度が1 mg/ml以下である場合、BSAが、1 mg/mlの最終濃度まで溶液に添加される。

本発明のアッセイに使用される抗体及び試薬抗体は、アビシン又はビオチンと共に共有結合され得る。適切な結合方法は、二官能基化合物を通じての架橋を包含する。適切な二官能基化合物は、Peters, E.など、Ann. Rev. Biochem. 48: 523 (1977) により記載される。アルキルイミダートは、タンパク質によりそれらに示される官能基の間で高い程度の特異性を示す。その反応は一次アミノ基に対して特異的である。適切なカッピング試薬の例は、アミドエステル、たとえばジメチルマロニイミダート、アジド、たとえばアミド結合を生成するためにイムノ基と容易に反応するタルトリルジアジドのアシルアジドを包含する。アリールジハリド(たとえば1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン、又は4,4'-ジフルオロ-3,3'-ジニトロフェニルスルホン、グルタルアルデヒド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、ジマレイミド、混合された無水物、N-マレアミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホンイミドエステル、及び他の既知の架橋剤が使用され得る。

前述の試薬は、実質的に不可逆的な結合を提供する。官能基を有する二官能基、たとえばジスルフィド又はグリコールが使用され得る。それらは、所望により、単回反応の後、分離され得る結合を提供する。そのような試薬は、ジメチル-3,3'-ジオビスプロピオニイミダート、スクシニミジルプロピオニイミダート、N-(3-フルオロ-4,6-ジニトロフェニル)-シスクミン、タルトリルジアジド、タルトリルジ(グリシルアジド)及びタルトリルジ(エブリソン-アミノカブロイルアジド)を包含する。

## 特表平6-503645 (12)

他の場合、結合は、試薬自身の間で直線的に形成される。たとえば、抗体は、それぞれの材料上での官能基を過剰にビオチンに結合され得る。特定の例として、ビオチンは過ヨウ素酸塩により処理され、そしてアビジン結合へのビオチンを阻害しないで又は抗体の免疫学的活性をブロックしないで、シラフ基基形成を付与するためには抗体と反応せしめられる。アビジン-結合された及びビオチニル化された抗体は、Vector Laboratories, Burlingame, California から入手できる。

二官能基架橋剤を用いての既知の技法は、次のものを包含する：  
(a) 1段階グルタルアルデヒド結合、Avrameas, S., Immunochem. 6 : 43 (1969) ; (b) 2段階グルタルアルデヒド結合、Avrameas, S., Immunochem. 8 : 1175 (1971) ; 及び (c) ジマレイミド結合、Kato, K. など、Euro. J. Biochem. 62 : 285 (1966)。

抗体は、Bastowich, D. など、J. Appl. Rad. 35 : 554 ~ 557 (1984) 及び Buckley, R. など、Fed. Eur. Biochem. Soc. 166 : 202 ~ 204 (Jan. 1984) の方法に従って、金属放射性標識によりラベルされ得る。この方法においては、抗体はキレート剤、たとえば金属放射性標識とキレートを形成できるジエチレントリアミンベント酸 (DTPA) により結合される。DTPAの二段式調製物の  $0.1\text{mg}/\text{ml}$  の懸濁液は、熱水溶解、たとえばクロロホルム、エーテル又は熱水DMSOにおいて調製される。アリコートが、1 : 1のモル比のDTPA:免疫グロブリンを提供するのに十分な、それで乾燥した管に移され、そして室温下で保存される。懸濁液における0.05Mの炭酸水素塩緩衝液 (pH 7.0 ~ 7.5) 中、使用される抗体標識 (10 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) の10 ~ 20 $\mu\text{l}$  部分が、無水DTPAに添加され、そしてその内容物が0.5 ~ 1.0分間、搅拌される。結合されたタンパク質調製物が同じ緩衝液により0.2 $\text{ml}$  に希釈され、そして電荷緩衝液を用いて、SEPHADEX G-50

ゲルによる5 $\text{cm}$ ゲル通過カラム上で精製される。結合効率が、0.5 Mの酢酸緩衝液 (pH 6.0) 中、"キレート化一品種"の  $^{111}\text{In}$  の添加により、時間の間に決定される。薄層クロマトグラフィーが、結合効率の計算のためにDTPA結合抗体を分離するために使用される。DTPA結合抗体は、金属放射性標識、たとえば  $^{111}\text{In} + 3$ ,  $^{113}\text{In} + 3$  及び  $^{113}\text{Ca} + 3$  と結合するために必要なまで、4℃で貯蔵され得る。

本発明は、次の特定の実験例によりさらに示されるが、但しそれは非制限的な例である。特にことわらない限り、温度は $^{\circ}\text{C}$ であり、そして%は重量%である。

### 実施例1

ポリクローナル抗体- (胎児フィプロネクチン) 抗体

胎児フィプロネクチンを、Engzell and Buelabekli, Int. J. Cancer 20 : 1 ~ 5 (1977) により記載されているようにして牛水から精製する。

抗体- (胎児フィプロネクチン) 抗体を、文献、たとえばSteller, Beh. Enzym. 70 : 70 (1980) に記載される免疫化技法及びスケジュールを用いてウサギに誘発し、胎児フィプロネクチン抗原によりウサギを免疫化する。抗体、たとえば、Lange など、Clin. Exp. Immunol. 25 : 191 (1976) 及びPlisztskyなど、J. Immun. Meth. 41 : 187 (1981) により記載されるような、モノクローナル抗体のために使用されるアセイに最適する固相アセイにおいてスクリーンする。

抗血清のIgG画分を、胎児フィプロネクチンが結合されている CIBER-Sephadex G-45 (Pharmacia Fine Chemicals) を用いてアフィニティーコロマトグラフィーによりさらに精製する。結合のために使用される方法は、ゲル調製者、Affinity Chromatography, Pharmacia Fine Chemicals, pp 15 ~ 18により記載される方法であ

る。

カラムを2 ~ 3体積の緩衝液 (0.01MのPBS, pH 7.2) により平衡化し、そして抗体- (胎児フィプロネクチン) 抗体含有溶液を次にカラムに適用する。溶液の吸光度を、タンパク質がカラムからもはや通過しなくなるまで、280 nmでモニターする。次に、カラムを0.1Mのグリシン緩衝液 (pH 2.5) により洗浄し、イムノアフィニティー結合された抗体- (胎児フィプロネクチン) 抗体を脱着する。ピーカ画分を集め、ブールし、そして複数回の緩衝液の交換を伴って、0.01MのPBS (pH 7.2) に対して4度で24 ~ 36時間、透析する。より高い純度が希望される場合、アフィニティー精製されたIgGを、上記方法により成人の血清フィプロネクチン結合アフィニティーカラムに通し、成人の白質フィプロネクチンと交差するいづれかの抗体を除去する。

### 実施例2

モノクローナル抗体- (胎児フィプロネクチン) 抗体

実施例1の方法により得られた精製胎児フィプロネクチンを用いて、胎児フィプロネクチンに対するマウスモノクローナル抗体を、Golde and Billestein, Meth. Enzym. 73 : 1 (1981) 及びBastowich, R. and Nakamoto, S. など、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 6517 ~ 6521 (1985) の標準方法を用い、そしてマウスの免疫化のための抗原として胎児フィプロネクチンを用いて得る。モノクローナル抗体を、文献、たとえばLange など、Clin. Exp. Immunol. 25 : 191 (1976) 及びPlisztskyなど、J. Immun. Meth. 41 : 187 (1981) に記載される技法の要徴を用いてスクリーンする。

マウスモノクローナル抗体を、Maison, Practice and Theory of Enzyme Immunoassay, Elsevier Science Publishers, pp 105 ~ 107 (1985) の方法に従って、Protein-A結合Sephadex-G-45 (Pharmacia

Fine Chemicals) を用いて、腹水又はハイブリドーマ培養上清液から精製する。

### 実施例3

ポリクローナル抗体- (胎児フィプロネクチン) 抗体-被覆のマイクロタイパレート

実施例1に記載されるように成人フィプロネクチン交叉反応性を除去するために調製され、そしてさらに精製されたウサギ抗体- (胎児フィプロネクチン) を、0.05Mの炭酸緩衝液 (pH 9.6) により10  $\text{ml}$  に希釈する。その100  $\mu\text{l}$  を、Tissue-G マイクロタイパレート (Dynatech) の個々のウェル中に分注する。プレートを被覆し、そして室温で4時間又は4℃で一晩インキュベートする。プレートを洗浄緩衝液 (0.02MのトリスHCl, 0.015MのNaCl, 0.05%のTween-20) により、ウェルを洗浄し、そして空にすることによって4度洗浄する。次に、プレートを、ブロッキング緩衝液 (0.01MのPBS, 1%のBSA, 0.02%のFBS, pH 7.4) 200  $\mu\text{l}$  を個々のウェルに分注し、そして室温で1時間インキュベートすることによってブロッキングする。次に、ウェルを、上記のようにして洗浄緩衝液により4度洗浄する。プレートは、その時点で、ランブルのイムノアセイに使用できる。

### 実施例4

ポリクローナル抗体-ヒトフィプロネクチン抗体

ヒト血清フィプロネクチンを、Engzell and Buelabekli, Int. J. Cancer 20 : 1 ~ 5 (1977) により記載されるようにしてヒト血清から精製した。

抗体-ヒト血清フィプロネクチン抗体を、文献、たとえばSteller, Beh. Enzym. 70 : 70 (1980) に記載される免疫化技法及びスケジュールを用いてヤギに誘発し、ヒト血清フィプロネクチン抗原によ

りヤギを免疫化した。抗血清を、たとえばLanzaなど、Clin. Exp. Immunol. 25: 191 (1976) 及びPisetskyなど、J. Immun. Meth. 41: 187(1981) により記載されるような、モノクローナル抗体のために使用されるアッセイに類似する固相アッセイにおいてスクリーンする。

抗血清のIgG 両分を、ヒト胎児フィブロネクチンが結合されているCHBr-Sephadex 4B (Pharmacia Fine Chemicals) を用いてアフィニティクロマトグラフィーによりさらに精製する。結合のために使用される方法は、ゲル製造業者、Affinity Chromatography, Pharmacia Fine Chemicals, pp 15 ~ 18により推奨される方法である。

すぐに、カラムを2~3 体積の緩衝液 (0.01MのPBS, pH 7.2) により平衡化し、そして抗ヒト胎児フィブロネクチン抗体含有溶液を次にカラムに適用する。溶出液の吸光度を、タンパク質がカラムからもは今通過しなくなるまで、280 nmでモニターする。次に、カラムを、280 nmでの基準吸光度が得られるまで、平衡化緩衝液により洗浄する。

イムノアフィニティー結合された抗ヒト胎児フィブロネクチン抗体を、0.1Mのグリシン緩衝液 (pH 2.5) により溶解する。ビーカーを、1%のソルビトールを含む緩衝液に移し、緩衝液の交換を2回行う。次に、0.01MのPBS (pH 7.2) に對して1~2時間、透析した。

上記方法をくり返し、ヒト血清フィブロネクチンによりウサギを免疫化し、そして得られたポリクローナル抗ヒトフィブロネクチン抗体を精製した。

#### 実施例5

ポリクローナル抗 フィブロネクチン抗体 - 緩衝マイクロタイ

モノクローナル抗体を、次の方針によるイムノアッセイへの使用のために調製した。培養上清液又は腹水のIgG 両分を、硫酸アンモニウム分別により沈没せしめた。抗体を、製造業者の指針に従って、Protein-G Fast Flow (Pharmacia Fine Chemicals) 上でのアフィニティクロマトグラフィーによる精製のために適切な緩衝液中に再溶解し、そして透析した。

#### 実施例7

モノクローナル抗体 - 緩衝のマイクロタイアプレート

マイクロタイアプレートを、下記方法に従って、FDC-5 モノクローナル抗体により被覆した。

実施例6に記載されるようにして調製されたモノクローナル抗体 FDC-6 を、リン酸緩衝液 (pH 7.2) に希釈し、10 μg/mlにし、そしてウェル当たり100 μlをポリスチレンマイクロタイアプレート (Costar) 中に分散した。プレートを室温で2時間又は4にて一晩インキュベートした。ウェルの含有物をアスピレートし、そしてウェルを実施例5に記載されるように洗浄緩衝液 (0.02Mのトリス HCl, 0.01MのNaCl, 0.05%のTween-20) により3~4度洗浄した。次に、200 μl/ウェルのブロッキング/安定化液 (4%のスクロース、1%のマンニトール、0.5%のカゼイン、0.01MのPBS) をウェルに添加し、そして室温で30分~4時間インキュベートした。次に、ウェルをアスピレート乾燥し、そしてプレートを乾燥パウチにより気密容器にパッケージし、そして必要とされるまで、4にて貯蔵した。

上記方針を、Bosc and Dynatech からのマイクロタイアプレートを用いてくり返し、そして両者の結果を付りした。

#### 実施例8

開業ラベルされた抗-(フィブロネクチン) 抗体

#### 一プレート

実施例4に記載されるようにして調製されたヤギ抗ヒト血清フィブロネクチンを、0.05Mの度酸緩衝液 (pH 9.6) により10 μg/mlに希釈する。100 μlを、たとえばCostar, Bosc, 又はDynatech により供給されるポリスチレンマイクロタイアプレートの個々のウェル中に分散する。プレートをカバーし、そして室温で2~4時間又は4にて一晩インキュベートする。プレートを、洗浄緩衝液 (0.02Mのトリス HCl, 0.015MのNaCl, 0.05%のTween-20) により、個々の使用のために調製し、そして完全に空にすることによって3~4度洗浄する。次に、プレートを、200 μlのブロッキング/安定化液 (4%スクロース、1%マンニトール、0.01MのPBS, 1%のBSA, 0.02%のNaCl, pH 7.4) を個々のウェル中に分散することによってブロッキングし、そして室温で30分~2時間インキュベートする。次に、ウェルを前記乾燥し、プレートを乾燥パウチにより気密容器においてパッケージし、そして必要とされるまで4にて貯蔵する。

#### 実施例6

ハイブリドーマBB9018からのモノクローナル抗体

American Type Culture Collectionに寄託され、そして受託番号 ATCC HB9018 であるハイブリドーマの調製法は、引用により本明細書に記載される、1990年1月16日に公開されたアメリカ特許第4,894,326号 (Matzuraなど) に詳細に記載されている。

前記ハイブリドーマを、10%ウシ胎児血清により補充された RPMI 1640培養培養液において培養した。さらに、そのハイブリドーマを、Bisboll and Sbilt (Selected Methods in Cellular Immunology, V. B. Prentiss & Co, San Francisco, p368, 1980) の方法に従って、ハイブリッド細胞の注入によりマウスにおいて培養した。

FDC-6 と命名され、そして前記ハイブリドーマにより生成された

実施例4に従って調製された抗ヒト胎児フィブロネクチン抗体を、Avrameas, Immunochim. 6: 43 (1969) の1段階グルタルアルデヒド方法に従ってアルカリホスファターゼにより結合した。

#### 実施例9

胎児フィブロネクチンアッセイキット及び方法

好みの屋根において、胎児網膜抗原、すなわち胎児フィブロネクチンのためのアッセイキットは、次の試薬を含んだ:

1. ネズミモノクローナル抗ヒト胎児フィブロネクチン抗体により被覆されたマイクロタイアプレート、
2. アルカリホスファターゼ結合のアフィニティー精製されたポリクローナルヤギ抗フィブロネクチン抗体、
3. 飼育基質、
4. 食の封液、
5. 正の封液、
6. すすぎ用緩衝液 (501)。

ネズミモノクローナル抗ヒト胎児フィブロネクチン抗体により被覆されたマイクロタイアプレート及びアルカリホスファターゼ結合のアフィニティー精製されたポリクローナルヤギ抗フィブロネクチン抗体を、それぞれ実施例7及び8に記載されるように調製した。マイクロタイアプレートを、乾燥剤を含む密封されたプラスチックパッケージにそれぞれ8個のウェルの12ストリップとしてパッケージした。貯蔵抗体接合体を、接合基剤 (0.05Mのトリス緩衝液, pH 7.2, 2%のカラソルビトール, 2%のBSA, 0.1%のアジ化ナトリウム, 0.01%のTween-20, 1%の塩化マグネシウム及び0.1%の電化亜鉛) により適切に希釈し、そしてその10μlをポリエチレンドロッパーボトル容器に入れた。

開業基質 (ポリエチレンドロッパーボトル容器において10μl) は、

0.1 mMの塩化マグネシウム及び0.2%のアジ化ナトリウムを有する0.4 Mのアミノノテルブロバンジオール緩衝液 (pH10) に希釈されたフェノールフタレンモノキスフェート (1:20/1) であった。

正の対照 (ポリエチレンドロッパーボトル容器122.5 ml) は、サンプル希釈液 (0.05 Mのトリス緩衝液, pH7.4, 1%のウシ血清アルブミン (BSA), 0.15 Mの塩化ナトリウム, 0.02%のアジ化ナトリウム, 5 mMのエチレンジアミン四酢酸 (EDTA), 1 mMのフェニルノチルスルホニルフルオロド (PMSF) 及び500 単位/mlのアプロテニン) に50 ml/mlの胎児フィプロネクチンの濃度に希釈された胎児フィプロネクチンを含む半水であった。このサンプル希釈液は、引用により本明細書に記載される、1990年4月16日に公開されたアメリカ特許第4,919,889号 (Jonesなど) に記載されている。

負の対照 (ポリエチレンドロッパーボトル容器に2.5 ml) は、胎児フィプロネクチンを含まない正の対照のために使用されるサンプル希釈液であった。

すすぎ緩衝液 (ポリエチレンドロッパーボトル容器に10 ml) は、1.0 Mのトリス緩衝液, pH7.4, 4.0 Mの塩化ナトリウム, 2.5%のTween-20及び1%のアジ化ナトリウムを含む50 ml緩衝液であった。すすぎ緩衝液は、アッセイに使用のために0.02 Mのトリス, 0.05 Mの塩化ナトリウム, 0.05%のTween-20及び0.02%のアジ化ナトリウムの最終濃度に水により希釈された。

キットはさらに、24個の5孔孔サイズのポリエチレンサンプルフィルター (Porex Technologies, Fairburn, Georgia), マイクロタピオーストリップホルダー, マイクロタピオーブレートカバー及び指針シートを含んだ。キットにおけるすべてのドロッパーボトルは、試験約50 ml液滴を分散するように企画されたポリエチレンボトル

であった。サンプル収集に続いて行なわれるすべてのアッセイは、キットにおける試薬及び材料を利用した。

アッセイは次のようにして行なわれた。すべてのサンプルを、ダクロンスワップを用いて、後方円筒口又は子宮口近くで収集した。スワップサンプルを、収集バイアルにおける1.0 mlのサンプル希釈液に含浸した。サンプル希釈液は上記の通りである。スワップを溶媒から除き、収集管にできるだけ液体を残した。サンプルを、通過の内又は後で、アッセイの前、15分間、アッセイキットからの対照と共に37°Cでインキュベートした。サンプルフィルターを個々のサンプル管上の特定の位置に置いた。8-ウェルストリップを、ストリップキルダーの位置に置いた。ホルダーは、12段及び8列の標準マイクロタイターブレートの英数字指示を有した。個々のサンプル及び正及び負の対照の二重の100 μlアリコートを、マイクロタイターストリップの個々のウェルに置き、そして室温で1時間インキュベートした。

インキュベーションの後、サンプル及び対照をウェルからアスピレートした。ウェルを、希釈された洗浄緩衝液 (12) により3度洗浄した。洗浄の後、100 μlの酵素-液体結合体を個々のウェルに添加し、そして室温で30分間インキュベートした。ウェルをアスピレートし、そして上記のように洗浄した。洗浄の後、100 μlの酵素基質を個々のウェルに添加し、そして室温で30分間インキュベートした。

インキュベーションの後、ブレードを手により又は臥式振盪機により軽く振し、ウェル内容物を混合した。ストリップのフレームを、ELISAブレードリーダーに配置した。550 nmでの個々のウェルの吸光度を測定した。個々のサンプル及び対照についての二重のウェルの平均吸光度を計算した。患者サンプルの吸光度が正の対照の

吸光度よりも低い場合、サンプルは陰性であり、これはサンプルにおける検出できないレベルの胎児フィプロネクチンを示す。サンプル吸光度が正の対照の吸光度よりも高いか、又は等しい場合、そのサンプルは陽性であり、これは胎児フィプロネクチンがサンプルに存在したことと示す。いづれかのアッセイにおいて、正の対照の吸光度が負の対照の吸光度の1.5倍以上でない場合、その結果は異常され、そしてアッセイ方法がくり返えされた。

#### 実施例10

##### 妊娠試験

妊娠試験を行なうために、子宮留置又は子宮口近くの腹腔から除去し、そして妊娠であると思われる婦人からの胎児剥離腔原、すなわち胎児フィプロネクチンの存在を決定するためにアッセイした。試験サンプルにおける有りな胎児フィプロネクチンを示す妊娠の23週前に得られたサンプルは、正常な子宮妊娠を示す。

スワップサンプルを、実施例9に記載されているようにして、393人の婦人から得た。試験された婦人のうち、50人が非妊娠 (NP) (血清又は尿ヒト胎毛性腺刺激ホルモン (hCG) の分析による) として確認され；333人が子宮内妊娠 (IP) (血清又は尿hCGの分析による) を有することが確認され；そして10人が子宮外妊娠 (ECT) (病理、血清hCG、臨床学的試験及び手術による確認による) を有することが確認された。

アッセイを、実施例9に記載されるようにして行なった。但し次の例外が存在する。抗体結合体は、0.02 Mのトリス、0.3 mMのNaCl、0.05%のTween 20、5.0%のBSA、0.02%のNaHCO<sub>3</sub>において1:1,000に希釈されたヤギ血清ヒトフィプロネクチン (Jackson Immuno

Research Labs, カタログ番号109-056-059) であった。酵素基質は、APP緩衝液 (Sigma Chemical Co. カタログ番号222) に希釈されたバ

ラーニトロフェニルホスフェート (Sigma Chemical Co. カタログ番号104-107) であった。さらに、サンプルを通過よりもむしろ遠心分離し、液体を除去した。この試験に関しては、サンプルにいづれかの胎児フィプロネクチンを検出するアッセイが陽性試験として評定された。試験の結果10下記に示される。

基團	IP	NP
NP = 50	42	8
IP = 333	72	261
ECT = 10	3	7
妊娠 = 243	75	258

試験結果の分析は下記に示される。第1の分析は子宮外妊娠を有する婦人からの結果を含まない。第2の分析は、子宮外妊娠を有する婦人からの結果を含む。分析において、次の略語が使用された。“Se”は受容性を意味する (前記条件を有する婦人の合計数により割り算された正しい陽性試験結果の数；すなわち正しい陽性及び誤った陽性試験結果の合計により割り算された正しい陽性試験結果の数)。“Sp”は特異性を意味する (前記条件を有さない婦人の合計数により割り算された正しい陰性試験結果の数；すなわち正しい陽性及び誤った陽性試験結果の数の合計により割り算された正しい陽性試験結果の数)。“PPV”とは、陽性の予測値を意味する (陽性として試験されたサンプルの合計数により割り算された正しい陽性試験結果の数)。“NPV”とは陰性の予測値を意味する (陰性として試験されたサンプルの合計数により割り算された正しい陰性試験結果の数)。

特表平6-503645 (15)

例10に記載されているようにして分析される。感度性、特異性、陽性の予測値及び陰性の予測値は、この分析において子宮外妊娠の検出に基づかれている。

妊娠:

	TFn >.5	TFn <.5	
非ECT	135	198	333
ECT	0	10	10
	135	208	343

合計妊娠数

$$Se = 10/10 = 100\%$$

$$Sp = 135/333 = 41\%$$

$$PPV = 10/208 = 5\%$$

$$NPV = 135/135 = 100\%$$

上記結果は、陽性試験結果が、婦人が子宮外妊娠を有さない高い程度の信頼性を提供することを示す。すなわち、それらのサンプルに関しては、婦人が子宮内妊娠を有することを示唆する試験結果の100%が正しかった。従って、その試験は“ECT における規則 (Rule 1: ECT)” 試験として評価づけられ：特に、0.5  $\mu$ g/ml以上の胎児フィブロネクチン濃度が子宮内妊娠を示す。

実施例11

子宮外妊娠試験

実施例10の方針を、同じサンプルを用いてくり返した。しかしながら、この場合、0.5  $\mu$ g/mlの胎児フィブロネクチンのカットオフ（負の対照の値 + 2つの標準偏差）が、胎児フィブロネクチンの存在についての陽性試験結果のためには使用された。データは、実施例9に記載しているようにしてアッセイした。0.11  $\mu$ g/mlのフィブロネクチンカットオフ（負の対照値 + 2つの標準偏差）を用いて、陽性を決定した。

この研究においては、291人の婦人からの93%の物質は子宮内妊娠であることが確認され、そして8人の婦人は子宮妊娠（2人は子宮外妊娠であり、そして6人の婦人は非妊娠であった）ではなかった。結果は、下記に示される。

	TFn ≥ .11	TFn < .11	
POC	288	3	291
非妊娠	0	8	8
	288	11	299

$$Se = 288/291 = 99\%$$

$$Sp = 8/8 = 100\%$$

$$PPV = 288/288 = 100\%$$

$$NPV = 8/11 = 72.7\%$$

妊娠の生成物を含むサンプルにおいては、有意味量の胎児フィブロネクチンが見出され：これは正常な妊娠の存在及びその妊娠を確認した。データはまた、負のアッセイ結果を有する妊娠の患者において、子宮外妊娠の可能性が示唆されることも示す。

実施例12

治療用洗浄試験の生成物

治療用洗浄から得られたサンプルを試験し、胎児性物質が子宮から除去されたかを確かめた。アッセイは例9におけるようにして行なわれた。但し次の例外を伴った。サンプルを、繊維状の綿を通しての水性通過により妊娠の生成物から試験管中に吸引し、2000rpmで10分間、遠心分離し、そして上清液を追加の洗浄を作わないで胎

実施例13

早期分娩サンンドイッチタイムアッセイ

実施例9の方針を、妊娠の20-36週で得られた試験サンプルによりくり返した。研究は、アメリカ合衆国における3種の周産期紹介は産所で行なわれた。婦人を、既に疑わしい早期破膜又は調べられていない膜を有する疑わしい早期分娩のいづれかのために病院への入院について評価された。

膜の破膜の確認は、羊水の全体のアーリングについての膜の膜での試験、ニトラジン紙を用いてアルカリ性膜分認の存在、シグ状結晶形成のために乾燥された膜分認の膜破膜試験及び羊水過少症の越音検査により行なわれた。膜の破膜は、それらの4種の診断基準のうちいづれかの2つの存在により定義された。23週-36週の妊娠、既往の知られている月経期間に基づいての6日月の妊娠、及び初めの3ヶ月の骨盤試験により及び28週以下の妊娠を超音波処理的に確かめられた出産の予定日の妊娠の膜なれていない羊膜を有する117人の婦人が統計で記載される。婦人は、病歴及び子宮収縮の記録を含むする四半ば紙及び子宮の試験に基づいて、早期分娩及び膜の出産のために危険であることが主車両により決定された。早期分娩の臨床学的定義は確立するのに日々困難であるので、胎児フィブロネクチンの臨床学的利用性を確立するデータは、種々の結果として早期分娩を用いて分析された。

母方の胎児フィブロネクチンによる子宮腔汚染についての可能性を評価するために、母方の血液検体を、第2又は第3のトリメスターの間、明らかに現象的な妊娠の52人の婦人から得た。羊水検体を、初期の第2のトリメスターにおいて追は子宮頸のために羊水穿刺を受ける92人の患者及び第3のトリメスター、遅延的な帝王切開の前、胎児の膜の成熟の評価のために羊水穿刺を受ける8人の患者から得

第表平6-503645 (16)

的な予測物であった。それらの患者における胎児フィプロネクチンの存在は、3.79の算定回帰推定比により早期出産の危険性に強く関係した (95% CI : 2.33, 6.15;  $P < 0.01$ )。

母方妊娠の胎児フィプロネクチンにより混合する可能性について評価するため、データを、血液により汚染された31例のサンプルの抹除の後に分析した。下記に示されるように、類似する割合の患者がそれらの子宮膜分離に胎児フィプロネクチンを有し、そして早熟出産した。さらに、胎盤の存在又は不在の割合は、1.70 (95% CI : 0.91; 3.18;  $P = 0.1$ ) の推定比を付与する回帰的算定回帰モデルに示し、それは、血液が、胎児フィプロネクチンが前記モデル中に導入された後、早熟出産の独立した予測体でないことを示す。しかしながら、血液により汚染された子宮膜における胎児フィプロネクチンの検出が切迫分娩のインジケーターであることは単一变量分析から明白であった。

	IFN <sub>+</sub>	IFN <sub>-</sub>	
PTD	49	10	59
TD	11	47	58
	60	57	117

+ 感受性 = 83.1%, 特異性 = 81.7%  
相対的危険比 = 20.9 (95% CI : 8.8, 49.7) :  
 $X^2$  ,  $P < 0.01$

疑わしい早期分娩及び損なわれていない胎膜を有する117人の患者について上記を示されるように、早熟出産する (PTD) 59人の婦人のうち49人 (感受性 = 83.1%) は、出産予定で出産する (TD) 58人の婦人のうち11人 (特異性 = 81.0%) に比較して、それらの子宮膜分離において胎児フィプロネクチンを有した ( $P < 0.01$ )。同時に、それらの子宮膜分離に胎児フィプロネクチンを有するそれらの患者は、子宮膜胎児フィプロネクチンを示さないそれらの婦人 (9% の予測値 = 82.5%) よりもより一層、早熟出産する (正の予測値 = 81.7%) 傾向があった。

子宮膜胎児フィプロネクチンの存在は、疑わしい早期分娩を有するそれらの婦人における早熟出産についての危険性の敏感度且つ特異

	IFN <sub>+</sub>	IFN <sub>-</sub>	
PTD	27	9	36
TD	7	43	50
	34	52	86

+ 感受性 = 75.0%, 特異性 = 86.0%  
相対的危険比 = 18.4 (95% CI : 5.7, 50.4) :  
 $X^2$  ,  $P < 0.01$

PTD のための危険性の婦人を同定するためへの胎児フィプロネクチンの有益性は、2% を超える子宮膜張と共に損なわれていない胎膜を有する早期分娩での婦人が分析から抹除される場合でさえ、維持された。3.18 (95% CI : 1.8, 5.6,  $P < 0.01$ ) の算定回帰推定比は、この臨床的に分離した群における胎児フィプロネクチンの

予測値を指証した。

	IFN <sub>+</sub>	IFN <sub>-</sub>	
PTD	20	8	28
TD	8	41	49
	28	49	77

感受性 = 71.4%, 特異性 = 83.7%  
相対的危険比 = 12.8 (95% CI : 4.5, 36.3) :  
 $X^2$  ,  $P < 0.01$

実施例14

破綻された臍サンドイッチイエノアッセイ

実施例9の方針を、20週の妊娠から得られた試験サンプルによりくり返した。この指標部位臨床研究の目的は、油剤妊娠及び疑わしい胎の破綻を有する婦人 (TRON) 、早期妊娠及び疑わしい胎の破綻を有する婦人 (PROM) 及び損なわれていない胎膜を第3のトリメスターにおいて有する妊娠の婦人 (対照) の膜分離における胎児フィプロネクチンを検出するためにイムノアッセイの効率を評価することであった。羊膜の破綻の推定上の診断は、実施例13に概略されている臨床的な基準に従って行なわれた。そのアッセイ結果は、人口統計学的特徴、産科歴及びサンプル収集と出産との間の期間を包含する現在の妊娠の特別な特徴により個々のグループについて分析された。胎児フィプロネクチンが、PROMでの85人の婦人、TRONでの339人の婦人及び対照の67人の婦人から得られた子宮膜分離において分析された。超音波により又は最後の知られた月経期間により確かめられるような既知の妊娠年齢の婦人についてのデータのみが統計的記載される。

次の表は、胎児フィプロネクチン結果により分類されるPROM、

TRON及び対照における婦人のためにサンプリング (EGAS) 及び出産 (EGAD) 並びにサンプリングと出産との間の期間 (SABDEL) で妊娠年齢 (週) についての個々の回数及び平均 ( $\pm SD$ ) を示す。データはまた、サンプリングの48時間以内で生じる出産の% (% B<sub>0</sub>) < 48 Hrs) 及びPROMにおける早期出産の% (% PTD) も提供する。

TRON

	IFN <sub>+</sub>	IFN <sub>-</sub>		IFN <sub>+</sub>	IFN <sub>-</sub>	
n	80	5		319	20	
EGAS (週)	32.3 (3.8)	30.4 (4.5)		39.3 (1.8)	38.9 (1.3)	
EGAD (週)	32.7 (4.0)	33.5 (6.0)		39.4 (1.8)	39.9 (1.4)	
SABDEL (時間)	58.0 (264)	542.0 (439)		18.1 (48)	163.4 (182)	
TD <sub>0</sub> < 48 Hrs	--	--		94.7	45.0	
PTD	97.5	60.0		--	--	

疑わしい胎の早期妊娠を有するPROMの85人の患者のうち、80人は彼らの子宮膜分離に胎児フィプロネクチンを有し、そして早熟出産した97.5% ( $n = 78$ ) は、羊膜が破綻されたことを示す。疑わしい胎の破綻を有するTRONの339人の患者のうち、319人は彼らの子宮膜分離に胎児フィプロネクチンを有し、そしてサンプリングの48時間以内で出産したのは23.1%であり、負の胎児フィプロネクチン結果を有する対照の婦人は5.3%であった。これらの結果は、胎の破綻の検出についての従来使用されて来た診断試験がしばしば信頼できなくなることを示唆する。さらに、陽性の胎児フィプロネクチン結果を有するすべての婦人は、陰性の胎児フィプロ

エクチン結果を有する婦人よりも有意に ( $P < 0.05$ ) により低いサンプルからの出産の期間を有した。

TRONにおける婦人から収集された339 例のサンプルのうち、胎血吸収の存在に関する情報は、316 人について利用できた。彼らのうち、90人 (28.5%) が胎血吸収の存在下で収集された。EGAS, EGAD, SANDEL及び% Del < 48 hrsが、次の表にそれらの婦人のため示される。EGAS及びEGADは胎血吸収を有する及び有さない婦人に因して類似するが、胎血吸収を有する婦人は確に血液を有さない婦人よりもよりやすく出産する ( $P < 0.05$ )。陽性結果の割合は、検体収集の時点で、腎における血液の存在又は不在にもかかわらず類似する。

IRON		
	血液+	血液-
n	90	226
EGAS (Weeks)	39.3 (1.0)	39.3 (1.1)
EGAD (Weeks)	39.4 (1.1)	39.4 (1.2)
SANDEL (Hours)	12.8 (23.7)	28.1 (111)
% Del < 48 hrs	91.2	95.6

この分析は、過分泌における血液の存在が婦人のこの集団についての試験結果に対して明らかな効果を有さないことを示す。対照におけるたった1人の婦人が胎血吸収を有するものとして固定された。彼女は負のアッセイ結果を有し、そして検体収集の後約135時間で出産した。

胎児フィプロネクチンは、羊膜の破壊を示す、羊水の検出のための最適なマーカーである。胎児フィプロネクチンは、羊水に高濃度で及び母方の血液に低濃度で存在する。子宮腔内における胎児フィ

脱分化された0.5%非脂肪ドライミルクのプロッキング試薬を頭に適用する。過剰のプロッキング試薬を、少なくとも約20分後に除去する。

四一極持続装置 (Target Device, V-Tech, Pasadena, CA)を、アッセイ試料からのサンプル溶液の吸着剤層への流れを調節するために抗体一担持層 (サンプル適用の方向における) の下に第2の多孔性層 (0.45  $\mu$  の低タンパク質-結合ナイロン, Le Prolyne, Pall) によりアセンブリーする。次に、2つの多孔性層を、1.5 ml以上の容量を有する吸着性多孔性ポリエチレン層 (Chromax, Brooklyn, NY) 上に配置し、そして装置に合図する。その装置を、乾燥剤を含む密封されたプラスチックバッグに個々にパックする。

コロイド状金を、0.16%のクエン酸ナトリウムによる0.01%のテトラクロロ金 (IV) 酸の還元により調製し、この装置においては、約30mlの粒子を製造する。平均に合及すれば、前記2種の溶液を90度に別々に加熱する。還元溶液を、激しく攪拌しながら、金溶液に添加する。その結合された溶液を少なくとも10分間、立揚する (100  $\text{Hz}$ )。

アフィニティー精製されたヤギ抗-フィプロネクチン抗体 (実験例4に記載されるようにして調製された) を、吸着によりコロイド状金に結合した。平均に合及すれば、上記で調製されたコロイド状金溶液を、水中で抗体 (5-10  $\text{mg}/\text{ml}$ ) と共に混合した。混合に続いて、その結合体溶液を、5%のBSA 及び5%のポリビニルビロリドン (最終濃度) の添加により安定化した。

ストック結合体を、中空繊維フィルターを用いての臍外透過により約10-12回に通す。その濃縮された結合体を、15mlのトリス、2%のBSA、0.1%のTriton X-100、0.2%のポリエチレングリコール、8%のメチルビニルビロリドン及び0.04%のチメロゲールにより適切

プロネクチンの免疫学的検出は、半胱が修飾されたかどうかを決定するために腎における羊水の存在又は不在を判定するための安全且つ効果的な方法である。

#### 実施例15

##### 胎児フィプロネクチンアッセイキット及び方法

もう1つの好ましい型様においては、胎児膜層流原、すなわち胎児フィプロネクチンのためのアッセイキットは、次の成分を含む。このキットは、急速な枕元アッセイを行うために使用されるように企画された。

1. プラスチック型ハウジングを含んでおり、そして

(a) モノクローナル抗体-胎児フィプロネクチン抗体を結合される多孔性ナイロン膜；

(b) 交換調整液システム；及び

(c) 吸着剤層

を含むアッセイ装置。

2. タンパク質マトリックスにおけるコロイド状金-ラベルされたヤギ抗-フィプロネクチン抗体結合体。

3. 結合体再構成試薬。

4. 洗浄溶波。

5. 乾燥されたダクロンサンプル吸収スリップ。

装置は次の方法により調製された。実施例6に記載されるようにして調製された2  $\times$  1のネズミモノクローナル抗体PDC-6を、pH 6の0.01Mのリン酸緩衝液溶液 (PBS)、0.5 mg/mlのBSAを含む0.1Mのクエン酸緩衝液における濃度 (1.2  $\mu$  のナイロン, Bioclyene-A, Pall) に適用する。同じ緩衝液中、実施例4に記載されるようにして精製されたヒト血清フィプロネクチンから成る半胱上の対照をまた、前記膜の別の領域に適用する。膜を空気乾燥した後、PBS-

なレベルに保持した。適切な濃度を、下記のようなサンプルアッセイ方法による広範囲の希釈度を用い、そして最良の結果を生成する希釈度を決定することによって決定した。

選択された結合体吸着液を、ポリエチレンサンプル吸収管に置き、そして液体乾燥せしめる。その管を、液体乾燥工程の間、2  $\times$  の孔サイズのポリエチレンサンプルフィルター (Pore Technologies, Fairborn, Georgia) により固定する。液体乾燥された結合体を、乾燥剤を含む袋ボウチに個々にパッケージする。

結合体再構成液は100  $\text{ml}$  の粉體ナトリウムである。この粉體は、1 gの使い捨て管における単位用置としてパッケージされる。

洗浄溶波は、使い捨て管に単位用置としてパッケージされる水である。

キットはさらに、個々にパッケージされた袋のダクロンスワップ及び手順要約カードを含む。

アッセイは次の通りにして行なわれる。

1. サンプルを収集する前、袋ボウチから液体結合体を含むプラスチック管を取り出し、スポイト端を除去し、そして液体再構成液を含む管の全内容物を添加する。

2. 供給されるスワップによりサンプルを収集する。試薬下での液体試験の間、腎の後部膜円管中にスワップを挿入し、約10秒間、くるくる回し、液体を吸収する。すぐに、試験を行なうために液体する。サンプルは、後の試験のために貯蔵され得ない。全液体結合体溶液にスワップを置き、そして10-15秒間、上下運動により急速に混合する。

3. 管の内部上でスワップの先端を回すことによってそのスワップからできるだけ多くの液体を除去する。たぶん感染性物質を取扱うスワップを持てる。

